

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Medicina**



**TESIS DOCTORAL**

**Virus de la hepatitis C:  
variabilidad en las regiones del CORE y NS5A y su impacto en la  
infección por el genotipo 1b**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**María Palomo Lastra**

Directores

**Juan J. Picazo de la Garza  
Avelina Suárez Moya**

**Madrid, 2016**

**VIRUS DE LA HEPATITIS C:  
VARIABILIDAD EN LAS REGIONES DEL  
CORE Y NS5A Y SU IMPACTO EN LA  
INFECCIÓN POR EL GENOTIPO 1b**

**Memoria para optar al Grado de Doctor  
presentada por**

María Palomo Lastra

Bajo la dirección,  
Prof. Juan J. Picazo de la Garza  
Dra. Avelina Suárez Moya



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

D. Juan J. Picazo de la Garza, Catedrático de Microbiología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y Jefe del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, y D<sup>a</sup>. Avelina Suárez Moya, Profesora Asociada del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense y Jefe de Sección del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico San Carlos de Madrid,

**CERTIFICAN:**

Que la presente memoria titulada **"VIRUS DE LA HEPATITIS C: VARIABILIDAD EN LAS REGIONES DEL CORE Y NS5A Y SU IMPACTO EN LA INFECCIÓN POR EL GENOTIPO 1b"**, ha sido realizada bajo nuestra dirección por D<sup>a</sup>. **María Paloma Lastra** en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid y estimando que se encuentra finalizada y en condiciones de optar al grado de Doctor se solicita su admisión a trámite para su lectura y defensa pública.

Madrid, a 8 de junio de 2015

Prof. D. Juan J. Picazo

Prof. D<sup>a</sup>. Avelina Suárez

A mi familia,

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer al Prof. Juan J. Picazo por la confianza que ha depositado en mí y permitirme formar parte de su equipo de trabajo, sin cuyo apoyo este trabajo no hubiera sido posible.

A la Dra. Avelina Suárez por su inestimable ayuda y orientación en este trabajo y su estímulo constante. Agredecer, además, su paciencia y comprensión, incluso en los momentos difíciles.

Al Prof. José M. Ladero, por su colaboración en el manejo clínico y su valioso asesoramiento en el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Ana Machuca, por su contribución y ayuda en el diseño y adaptación de los protocolos de trabajo a los equipos cedidos por Siemens.

Al Dr. Manuel Enrique Fuertes, del Servicio de Medicina Preventiva, por su ayuda en el tratamiento estadístico de los datos obtenidos en este trabajo y estar siempre dispuesto a aclarar mis dudas y preguntas.

A Mar y Maite, técnicos en la Sección de Serología, por su paciencia y ayuda con las técnicas de secuenciación.

Y a todos mis compañeros del Servicio de Microbiología Clínica.

## **VIRUS DE LA HEPATITIS C: VARIABILIDAD EN LAS REGIONES DEL CORE Y NS5A Y SU IMPACTO EN LA INFECCIÓN POR EL GENOTIPO 1b**

### **Introducción:**

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) tiene un gran impacto a nivel mundial, considerándose una de las principales causas de hepatitis crónica, enfermedad hepática terminal y hepatocarcinoma.

Hasta la incorporación de los nuevos agentes antivirales, el genotipo 1b era el que tenía tasas más bajas de respuesta viral sostenida (RVS); y a su vez, el de mayor prevalencia en nuestro medio. Lo que ha llevado a la búsqueda de marcadores predictores de respuesta, con el fin de identificar a aquellos pacientes que pudieran beneficiarse del tratamiento.

Estudios previos han mostrado que la variabilidad genómica en la región codificante de la proteína C del Core y en la región comprendida entre los aminoácidos 2209 y 2248 (región determinante de la sensibilidad al IFN: ISDR) de la región que codifica la proteína no-estructural 5A (NS5A) están relacionados con la respuesta al tratamiento con biterapia. Es por ello, que el **objetivo** de nuestro estudio es caracterizar a nivel genómico ambas regiones y analizar su impacto en pacientes con infección crónica por el genotipo 1b. Se analizan, además, otros factores basales implicados en la respuesta: sexo, edad y carga viral basal.

### **Material y métodos:**

Se analizaron las secuencias de la región del Core (45-125 aa.) y NS5A (2200-2260 aa.) de 70 pacientes con infección crónica por el VHC genotipo 1b. La caracterización genómica de ambas regiones se realizó mediante secuenciación directa tras la extracción de ARN viral y su amplificación por RT-PCR. Las secuencias así obtenidas fueron comparadas con una secuencia salvaje de referencia. La cuantificación de la carga viral se determinó mediante PCR a tiempo real. En 39 pacientes que finalizaron tratamiento se valoró el impacto de estos factores en la respuesta.

**Resultados:**

Se estudiaron 31 hombres y 39 mujeres, con edades comprendidas entre 29 y 76 años. La mayoría (84,3%) presentaban cargas virales basales elevadas (>400.000 UI/ml.).

En ambas regiones estudiadas se han observado mutaciones, aunque la mayoría de ellas eran puntuales. En la región del Core, la mayor tasa de mutación se ha encontrado en los codones 91 (64,3%), 75 (58,6%) y 70 (50%); siendo las mutaciones más frecuentes: L91M, T75A y R70Q. En la región ISDR, la mayor tasa se observó en el codón 2218 (44,3%), con la expresión de arginina (H2218R).

En cuanto al impacto en la respuesta al tratamiento, tanto el tener 45 años o más ( $p=0,018$ ), como una carga viral basal >400.000 UI/ml., ( $p=0,042$ ) fueron factores asociados con fracaso al tratamiento. Los hombres tuvieron una peor respuesta que las mujeres, rozando el nivel de significación ( $p=0,093$ ).

La presencia de sustituciones en el aminoácido 70 del Core se ha asociado con falta de respuesta en estudios previos y en nuestros pacientes ( $p=0,028$ ). La variabilidad en otros aminoácidos no ha mostrado relación con la respuesta, aunque aquellos con mutaciones en el aminoácido 91 respondieron peor y sólo se observaron mutaciones en el aminoácido 110 en el grupo de fracaso.

En el análisis de la región ISDR, se consideró como variante salvaje, aquella sin mutaciones o con una sola mutación; y, variante mutante si presentaba 2 o más. En nuestros pacientes hay un predominio de la variante salvaje del virus (65,7%), aunque el análisis de la variabilidad en esta región, por sí sola, no ha mostrado diferencias significativas en relación con la respuesta.

Considerando el análisis estratificado en función de la presencia de mutaciones en el aminoácido 70 del Core y la variabilidad en la región ISDR, el 75% de nuestros pacientes con ambas regiones favorables alcanzaron RVS, mientras que no respondieron el 90,9% si ambas regiones eran desfavorables. Con sólo una de las dos regiones desfavorables también hubo una peor respuesta: el 85,7% si presentaban sustituciones en el Core70, y el 64,7% con la variante salvaje del ISDR.

El análisis conjunto de las mutaciones en el Core70, teniendo en cuenta, además, la variabilidad en la región ISDR, parece mejorar la predicción de respuesta.

**Conclusiones:**

En nuestros pacientes, la edad, la carga viral basal y las mutaciones en la región del Core se han asociado con fracaso al tratamiento, pudiendo emplearse como marcadores de respuesta.

El estudio conjunto de ambas regiones podría aportar una mayor capacidad de predicción que si sólo se tienen en cuenta las mutaciones en la región del Core.

En relación al importante avance en el tratamiento de la hepatitis C, el estudio de estas regiones podría seguir teniendo interés, sobre todo, en las terapias que empleen moléculas cuyo mecanismo de acción implique a las regiones estudiadas.

**Palabras clave:** VHC (Virus de la Hepatitis C); Genotipo 1b; Core (Región del Core); ISDR (Interferon sensitivity-determining region).



## HEPATITIS C VIRUS: VARIABILITY IN THE CORE AND NS5A REGIONS AND THEIR IMPACT ON THE GENOTYPE 1b INFECTION

### Background:

Hepatitis C virus (HCV) infects an estimated 170 million people worldwide and is regarded to be one of the main causes of chronic hepatitis, terminal liver disease and hepatocellular carcinoma.

Until the new antiviral agents were introduced, the genotype 1b was the most prevalent in our patients and had the lowest sustained viral response (SVR) rates, which led to the search for predictive markers of response to be able to identify patients who might benefit from this treatment.

Previous studies have shown that mutations either in the coding region of the C protein of the Core region or in the region between the amino acids 2209 and 2248 (interferon sensitivity-determining region: ISDR) of non-structural 5A (NS5A) gene of HCV, are related predictive factors of response to the therapy.

The **aim** of this study was to investigate the mutations in both regions and their impact in patients with chronic HCV 1b infection. It furthermore intends, to analyze other factors involved in the response such as gender, age and baseline viral load.

### Methods:

Amino acid substitution in sequences from the HCV Core region (45-125 aa.) and NS5A region (2200-2260 aa.) from 70 patients with chronic hepatitis C genotype 1b were analyzed. The genomic characterization of both regions was determined by direct sequencing after extraction of viral RNA and its amplification using RT-PCR. The sequences obtained were compared against a wild reference sequence of each of region. Viral load was detected using Real-Time RT-PCR. The impact of these factors in the response was assessed in 39 patients, subjected to the completed the therapy.

**Results:**

31 men and 39 women were studied, aged between 29 and 76 y/o. The majority (84.3%) had high viral loads (>400,000 UI/ml.).

Mutations were observed in both regions studied, although most of them were point substitutions. In the Core region, the highest mutation rate was found at the codons 91 (64.3%), 75 (58.6%) and 70 (50%); with L91M, T75A and R70Q being the most frequent mutations. In the ISDR region, the highest rate was observed at codon 2218 (44.3%), with arginine expression (H2218R).

With regard to the impact in the response to the treatment, both being of ages 45 or over ( $p=0.018$ ), a higher viral load of 400.000 UI/ml. ( $p=0.042$ ), and substitutions at amino acid 70 in Core region ( $p=0.028$ ) were factors associated with treatment failure. Men presented worse response to the treatment than women, around the level of significance ( $p=0.093$ ).

The presence of amino acid 70 substitutions of the Core region has shown to be associated with response failure in previous studies and in our patients ( $p=0.028$ ). The variability in other amino acids was not of relevance to the response, although those with mutations at amino acid 91 had a poorer response and mutations at amino acid 110 were only observed in the failure group.

In the analysis of the ISDR sequences, those with one or no mutation were classified as wild-type variants, and those with 2 or more were classified as mutant-type. In our patients, there was a predominance of wild-type (65.7%), although the genome variations in this region did not show any significant differences in relation to the response.

Considering the stratified analysis in function of the presence of mutations in the amino acid 70 of the Core, and the variability in the ISDR region, 75% of our patients with both favourable regions reached SVR, while 90.9% did not respond if both regions were unfavourable. When only one of the regions was unfavourable there was also a poorer response: 85.7% if substitutions were present in the Core70, and 64.7% with the wild-type of ISDR.

The combined analysis of the mutations in the Core 70 seems to improve the response prediction, if it is accounted the variability of the ISDR region.

**Conclusions:**

In our patients, age, baseline viral load and mutations in the Core region have been associated with treatment failure and as such could be used as response markers.

The joint study of both regions could give a better response prediction, if only the mutations in the core region were taken into account.

With regard to the important advances in hepatitis C treatment, the study of these regions could still be of interest, above all with therapies that employ molecules whose action mechanism affects the regions studied.

**Key words:** HCV (Hepatitis C Virus); Genotype 1b; Core (Core region); ISDR (Interferon sensitivity-determining region)

<u>Índice</u>	<u>Páginas</u>
<b><u>I. Introducción</u></b>	<b>1</b>
<b>1.- ANTECEDENTES</b>	<b>2</b>
<b>2.- EL VIRUS DE LA HEPATITIS C</b>	<b>3</b>
2.1.- Estructura viral	3
2.2.- Replicación viral	5
2.3.- Variabilidad genética del Virus de la Hepatitis C	7
<b>3.- EPIDEMIOLOGÍA</b>	<b>9</b>
3.1.- Epidemiología y Genotipos	10
3.2.- Situación en España	11
<b>4.- VÍAS DE TRANSMISIÓN</b>	<b>13</b>
<b>5.- HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN</b>	<b>16</b>
<b>6.- DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO</b>	<b>19</b>
<b>7.- TRATAMIENTO</b>	<b>24</b>
<b><u>II. Objetivos</u></b>	<b>31</b>
<b><u>III. Material y Métodos</u></b>	<b>35</b>
<b>1.- DISEÑO DEL ESTUDIO</b>	<b>36</b>
<b>2.- PROTOCOLO DE ESTUDIO</b>	<b>40</b>
2.1.- Estudio de la región del Core	40
2.1.1.- SECUENCIA DE REFERENCIA	40
2.1.2.- CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE LA REGIÓN DEL CORE	41
2.2.- Estudio de la región NS5A	51
2.2.1.- SECUENCIA DE REFERENCIA	51
2.2.2.- CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE LA REGIÓN NS5A	51

2.3.- Optimización de los protocolos de secuenciación de ambas regiones	61
<b>3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	61
<b><u>IV. Resultados</u></b>	63
<b>1.- CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE AMBAS REGIONES Y PREVALENCIA DE MUTACIONES</b>	64
1.1.- Descripción del conjunto completo de la muestra	64
1.2.- Variabilidad genómica de la región del Core	65
1.3.- Variabilidad genómica de la región NS5A	70
<b>2.- ANÁLISIS DEL IMPACTO EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO</b>	74
2.1.- Descripción del grupo de pacientes tratados	75
2.2.- Estudio de variables epidemiológicas	75
2.3.- Estudio de variables dependientes del virus	77
2.3.1.- CARGA VIRAL BASAL	77
2.3.2.- ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES DE LA REGIÓN DEL CORE	78
2.3.3.- ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES DE LA REGIÓN NS5A	84
2.3.4.- ANÁLISIS CONJUNTO DE AMBAS REGIONES: SUSTITUCIONES EN EL CORE70 Y MUTACIONES EN LA REGIÓN ISDR	87
<b><u>V. Discusión</u></b>	93
<b><u>VI. Conclusiones</u></b>	109
<b><u>VII. Bibliografía</u></b>	111

## Índice de Figuras

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
<b>Figura 1</b>	Imagen de microscopía electrónica del VHC	3
<b>Figura 2</b>	Estructura del VHC	3
<b>Figura 3</b>	Esquema de la estructura genómica del VHC	4
<b>Figura 4</b>	Esquema representativo de la replicación del VHC	5
<b>Figura 5</b>	ARN viral del VHC en el interior de la célula huésped	6
<b>Figura 6</b>	Clasificación filogenética de los distintos genotipos y subtipos del VHC	8
<b>Figura 7</b>	Distribución geográfica de la prevalencia de la infección por el VHC.	10
<b>Figura 8</b>	Distribución geográfica de los genotipos del VHC	11
<b>Figura 9</b>	Distribución de los genotipos del VHC en España y el resto de Europa	12
<b>Figura 10</b>	Esquema de la historia natural de la infección por el VHC	16
<b>Figura 11</b>	Marcadores analíticos de la infección autolimitada por el VHC	20
<b>Figura 12</b>	Marcadores analíticos de la infección crónica por el VHC	21
<b>Figura 13</b>	Mecanismo de acción del interferón-alpha en los hepatocitos	25
<b>Figura 14</b>	Mecanismo de acción de diferentes antivirales de acción directa	28
<b>Figura 15</b>	Secuencia de referencia de la región del Core (133-375 nt.)	40
<b>Figura 16</b>	Imagen de la electroforesis en gel de agarosa tras las dos reacciones de amplificación de la región del Core	45
<b>Figura 17</b>	Imagen del electroferograma “forward” y “reverse” de una secuencia del Core a estudio	49
<b>Figura 18</b>	Imagen del análisis de la secuencia problema y su comparación con la secuencia de referencia de la región del Core.	49
<b>Figura 19</b>	Informe de mutaciones de la región del Core emitido por el secuenciador	50

<b>Figura 20</b>	Secuencia de referencia de la región NS5A (6598-6778 nt.)	51
<b>Figura 21</b>	Imagen del electroferograma “forward” y “reverse” de una secuencia a estudio de la región NS5A	59
<b>Figura 22</b>	Imagen del análisis de la secuencia problema y su comparación con la secuencia de referencia de la región NS5A	59
<b>Figura 23</b>	Informe de mutaciones de la región NS5A emitido por el secuenciador	60
<b>Figura 24</b>	Secuencias de la región del Core (45-125 aa.) de los 70 pacientes	66
<b>Figura 25</b>	Secuencias de la región NS5A (2200-2260 aa.) de los 70 pacientes	71
<b>Figura 26</b>	Distribución según la indicación de tratamiento y su respuesta	74
<b>Figura 27</b>	Análisis de la respuesta al tratamiento en función de la presencia de sustituciones en el Core70 y la variabilidad en la región ISDR	89

## Índice de Protocolos

<u>Protocolo</u>		<u>Página</u>
<b>Protocolo 1</b>	Preparación de los cebadores de las dos reacciones de amplificación de la región del Core	41
<b>Protocolo 2</b>	RT-PCR de la región del Core	42-43
<b>Protocolo 3</b>	PCR semianidada de la región del Core	44
<b>Protocolo 4</b>	Secuenciación de la región del Core	46-48
<b>Protocolo 5</b>	Preparación de los cebadores de las dos reacciones de amplificación de la región NS5A	52
<b>Protocolo 6</b>	RT-PCR de la región NS5A	53-54
<b>Protocolo 7</b>	PCR anidada de la región NS5A	55
<b>Protocolo 8</b>	Secuenciación de la región NS5A	56-58



## Índice de Gráficos

<u>Gráfico</u>		<u>Página</u>
<b>Gráfico 1</b>	Distribución según sexo	64
<b>Gráfico 2</b>	Distribución según edad	64
<b>Gráfico 3</b>	Distribución según el país de procedencia	65
<b>Gráfico 4</b>	Distribución según el número de mutaciones en la región del Core entre los aminoácidos 61 y 110	67
<b>Gráfico 5</b>	Frecuencia de mutaciones en la región del Core	68
<b>Gráfico 6</b>	Mutaciones más prevalentes en la región del Core	69
<b>Gráfico 7</b>	Frecuencia de mutaciones de aminoácidos y nucleótidos en la región del Core	70
<b>Gráfico 8</b>	Frecuencia de mutaciones en la región NS5A	72
<b>Gráfico 9</b>	Mutaciones más prevalentes en la región NS5A	73
<b>Gráfico 10</b>	Frecuencia de mutaciones de aminoácidos y nucleótidos en la región NS5A	73
<b>Gráfico 11</b>	Distribución según sexo en Respondedores y No-Respondedores	75
<b>Gráfico 12</b>	Distribución según edad en Respondedores y No-Respondedores	76
<b>Gráfico 13</b>	Distribución según edad, con el punto de corte en 45 años, en Respondedores y No-Respondedores	76
<b>Gráfico 14</b>	Distribución de la carga viral basal en Respondedores y No-Respondedores	77
<b>Gráfico 15</b>	Distribución según el número de mutaciones entre los aminoácidos 61-110 del Core en Respondedores y No-Respondedores	78
<b>Gráfico 16</b>	Frecuencia de mutaciones en la región del Core en los pacientes tratados	79
<b>Gráfico 17</b>	Mutaciones en el Core91 en Respondedores y No-Respondedores	80
<b>Gráfico 18</b>	Mutaciones en el Core75 en Respondedores y No-Respondedores	81

<b>Gráfico 19</b>	Mutaciones en el Core70 en Respondedores y No-Respondedores	81
<b>Gráfico 20</b>	Mutaciones en el Core106 en Respondedores y No-Respondedores	82
<b>Gráfico 21</b>	Mutaciones en el Core78 en Respondedores y No-Respondedores	83
<b>Gráfico 22</b>	Mutaciones en el Core110 en Respondedores y No-Respondedores	84
<b>Gráfico 23</b>	Frecuencia de mutaciones en la región NS5A en los pacientes tratados	85
<b>Gráfico 24</b>	Distribución del número de mutaciones en la región ISDR en Respondedores y No-Respondedores	85
<b>Gráfico 25</b>	Distribución según el número de mutaciones en la región ISDR en los 70 pacientes	86
<b>Gráfico 26</b>	Variante salvaje y mutante de la región ISDR en Respondedores y No-Respondedores	87
<b>Gráfico 27</b>	Porcentaje de fracaso según la presencia de sustituciones en el Core70 y la variabilidad en el ISDR	90
<b>Gráfico 28</b>	Probabilidad pronóstica de fracaso ante sustituciones en el Core70 y al añadir la variabilidad de la región ISDR	91

## Índice de Tablas

<u>Tablas</u>	<u>Página</u>
<b>Tabla 1</b> Distribución de la variante de la región ISDR ante la presencia de sustituciones en el Core70 en Respondedores y No-Respondedores	88
<b>Tabla 2</b> Presencia de sustituciones en el Core70 ante la variante de la región ISDR en Respondedores y No-Respondedores	88

## Abreviaturas

A: Alanina

aa.: Aminoácidos

AAD: Antivirales de acción directa

ABC: Área bajo la curva

Ac anti-VHC: Anticuerpos frente al VHC

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ALT: Alanil-aminotransferasa

ARN: Ácido ribonucleico

AST: Aspartato-transferasa

C: Cisteína

CLIA: Ensayo inmunoenzimático por quimioluminiscencia

cols.: Colaboradores

CV: Carga viral

D: Aspartato

ddNTP: Didesoxinucleótidos trifostado

DE: Desviación estándar

DNA POL: Polimerasa de ADN

dNTP: Desoxinucleótidos trifosfato

DTT: Ditiotreitól

E: Ácido Glutámico

EASL: “European Association for the Study of the Liver”

EH-AA: Antígeno asociado a las Hepatitis Epidémicas

EIA: Enzimoinmunoensayo

EMA: “European Medicines Agency”

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

F: Fenilalanina

G: Glicina

H: Histidina

HCSC: Hospital Clínico San Carlos  
HDL: Lipoproteínas de alta densidad  
HVR: Región hipervariable  
I: Isoleucina  
IC: Intervalo de confianza  
IFN: Interferón  
IgG: Inmunoglobulina G  
IgM: Inmunoglobulina M  
IL28B: Interleucina 28B  
IP: Inhibidor de la proteasa  
ISDR: Región determinante de la sensibilidad al interferón  
ISGs: Genes estimulados por el Interferón  
K: Lisina  
L: Leucina  
LIA: Inmunoanálisis lineal  
LDL: Lipoproteína de baja densidad  
M: Metionina  
ml.: Mililitro  
mmHg: Milímetros de mercurio  
N: Asparagina  
NCBI: "National Center for Biotechnology Information"  
nm.: Nanómetros  
nt.: Nucleótidos  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
OR: Odds Ratio  
ORF: "Open Reading Frame"  
P: Prolina  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
Peg-IFN: Interferón pegilado  
Q: Glutamina  
R: Arginina

RBV: Ribavirina

RIBA: Inmunotransferencia con antígenos recombinantes

RIQ: Rango intercuartílico

RNAasa: Ribonucleasa

Rnase-In: Inhibidor de ribonucleasa

RT: Transcriptasa inversa

RT-PCR: Transcriptasa inversa con reacción en cadena de la polimerasa

RVS: Respuesta viral sostenida

S: Serina

Seq Enz: Enzima de secuenciación

Seq Enz Dil: Enzima de secuenciación diluída

T: Treonina

TGF- $\beta$ 1: "Transforming Growth Factor Betta 1"

UI: Unidades Internacionales

UTR: "Un-translated región"

V: Valina

VHA: Virus de la Hepatitis A

VHB: Virus de la Hepatitis B

VHC: Virus de la Hepatitis C

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

W: Triptófano

Y: Tirosina

# I. Introducción

La infección por el Virus de la Hepatitis C (VHC) tiene un gran impacto a nivel mundial considerándose una de las principales causas de hepatitis crónica, enfermedad hepática terminal y hepatocarcinoma. Se estima que 350.000 personas mueren al año por causas relacionadas con la infección en el mundo.

### **1.- ANTECEDENTES**

Se pueden encontrar reseñas históricas de las hepatitis desde Hipócrates que describió el “Íctero”, donde las hepatitis estaban confundidas entre los síndromes ictericos. Ya en el siglo VIII se le atribuyó una causa infecciosa.

Tras la II Guerra Mundial se clasificaron en hepatitis infecciosa o epidémica de transmisión entérica, y hepatitis sérica relacionada con el uso de sangre o sus productos contaminados.

No fue hasta finales de los años 60, cuando Blumberg describe el “antígeno Australia” en pacientes con leucemia (1, 2) y Prince, el “antígeno SH” (3). Se trataba del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.

En 1970, Del Prete describió el antígeno asociado a las hepatitis epidémicas (EH-AA), (4). Tres años más tarde, Feinstone y Purcell observan partículas virales en las deposiciones de enfermos de hepatitis epidémica entérica (5). El virus de la hepatitis A queda identificado.

Sin embargo, quedaba un grupo de hepatitis en las que no se encontraban marcadores de hepatitis A ni B. Se las denominó “hepatitis noA-noB”, sospechándose la presencia de otro u otros virus hepatotropos aún no conocidos.

No fue hasta 1989, cuando Houghton y sus colaboradores de la compañía Chiron Corporation, consiguieron clonar una molécula de ADN complementario derivado de una molécula de ARN del suero de pacientes diagnosticados de hepatitis noA-noB (6). El virus de la hepatitis C acababa de ser descubierto.



## 2.- EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

### 2.1.- Estructura viral

El virus de la hepatitis C se ha clasificado dentro de la familia *Flaviviridae* del género *Hepacivirus* (7). Está relacionado con los *Flavivirus* y los *Pestivirus*, pero no con otros virus conocidos de hepatitis.

Tiene un diámetro de 55-65 nm., de forma elíptica con proyecciones espiculares (Figura 1), (8). Consta de una envoltura lipídica en la que se anclan las glicoproteínas E1 y E2, y que reviste la proteína C de la nucleocápside en cuyo interior se encuentra el genoma viral (Figura 2), (9).

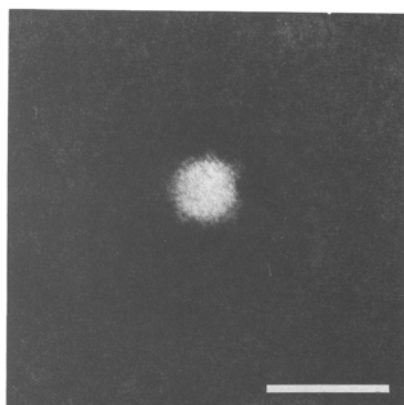


Figura 1- Imagen de microscopía electrónica del VHC. Adquirido de Kaito M et al. *J Gen Virol.* 1994 (8)

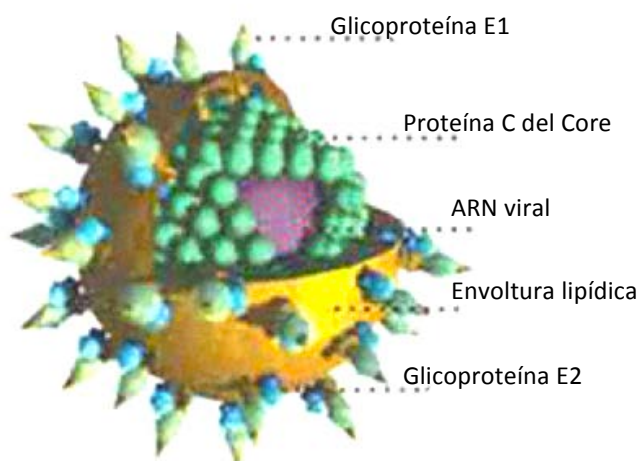
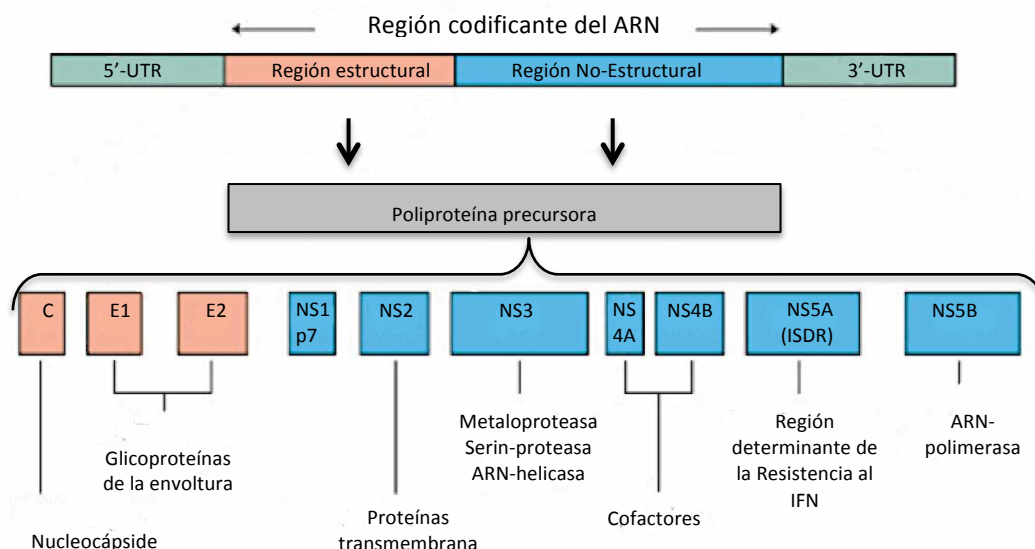


Figura 2- Estructura del VHC. Adaptado de Louis E. *The PNR Notebook Online* (9)

Su genoma es una única molécula de ácido ribonucleico monocatenario de 9.379 nucleótidos (nt.) de polaridad positiva en un marco de lectura abierta (ORF), (6, 10). Codifica una poliproteína de 3.011 aminoácidos (aa.) que al ser procesada secundariamente da lugar a las proteínas virales (Figura 3), (10, 11).



**Figura 3 – Esquema de la estructura genómica del VHC. Adaptado de Ashfaq UA et al. Genet Vaccines Ther. 2011 (11)**

Ambos extremos del genoma corresponden a dos regiones no-codificantes (UTR). La correspondiente al extremo 5' (5'-UTR) de unos 340 nucleótidos está altamente conservada, empleándose para el diagnóstico por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). Sin embargo, la región 3'-UTR es muy variable entre los distintos genotipos.

Los genes estructurales se localizan en el extremo 5'. Codifican las proteínas de la partícula viral: Proteína C del Core que forma la nucleocápside, región estructural más conservada. Y la región E que codifica las glicoproteínas de la envoltura E1 y E2 que se caracterizan por una marcada variabilidad, incluso dentro del mismo individuo, especialmente en dos regiones hipervariables (RHV-1 y RHV-2) localizadas en la región E2/NS1.

La región no-estructural se encuentra en el extremo 3'; tiene cuatro zonas: NS2, NS3, NS4 y NS5 que codifican enzimas virales implicadas en el procesamiento de la poliproteína y en la replicación viral.

## 2.2.- Replicación viral

No precisa integrarse en el núcleo celular, con lo que el ciclo replicativo (Figura 4) se realiza en el citoplasma de hepatocitos, pero también en células dendríticas (12) o linfocitos B (13).

No se conoce el mecanismo por el cual entra en el interior de la célula, pero parece estar relacionado con las glicoproteínas de la envuelta, E2 y/o E1, que son capaces de unirse a distintos receptores celulares: Receptor de LDL, receptor de clase B tipo I o la proteína CD81, entre otros (14, 15).

Esta interacción de receptores virales y celulares desencadena un proceso de endocitosis por el cual el virus entra en la célula perdiendo la envuelta y dejando expuesto su genoma.

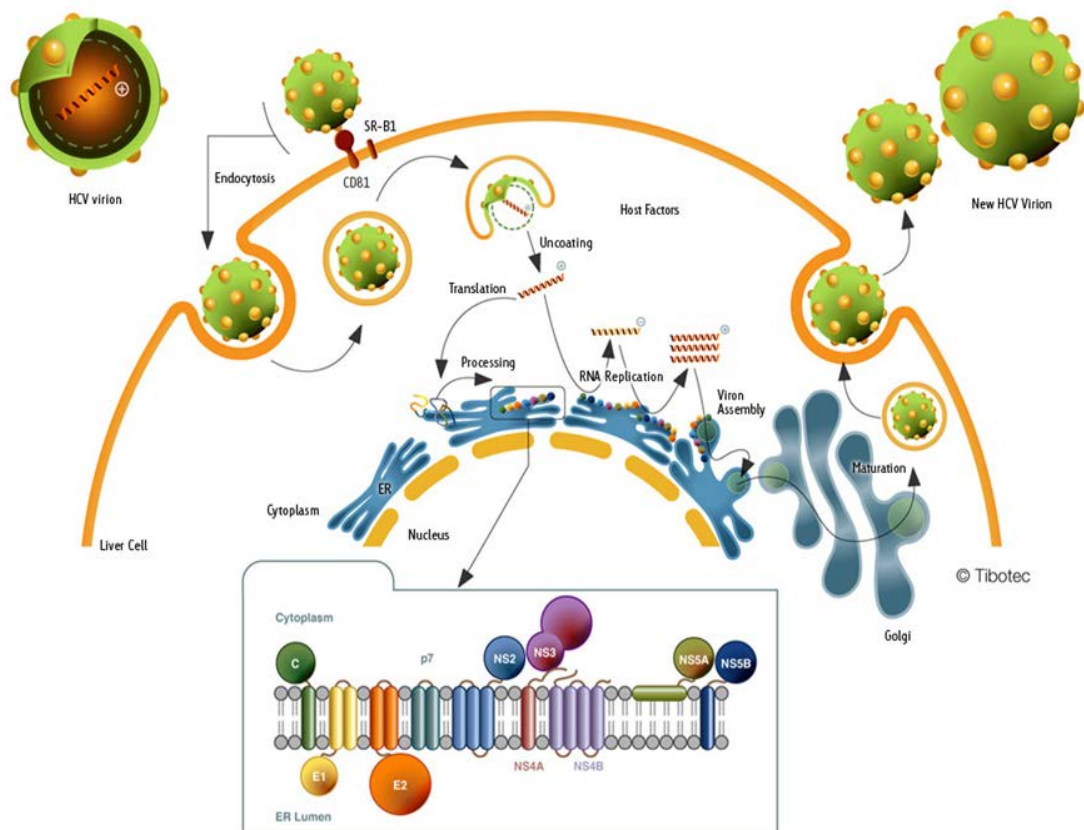


Figura 4 – Esquema representativo de la replicación del VHC. Adquirido de Micheloud D. Epidemiología Molecular de Enfermedades Infecciosas (16)

Una vez en el citoplasma celular, se une a los ribosomas por una zona específica de la región 5'-UTR iniciándose la traducción del ARN viral, que es regulada por la región 3'-UTR. El resultado es una poliproteína en el retículo endoplásmico rugoso que es procesada secundariamente por proteasas generándose las proteínas virales.

Las proteínas C del Core, E1 y E2 son liberadas por la acción de proteasas celulares, quedando unidas a las proteínas no-estructurales por un polipéptido de membrana (p7) implicado en la liberación de la progenie viral.

Las proteínas no-estructurales son liberadas por proteólisis mediada por la proteasa viral NS3, o por un proceso autocatalítico (NS2-NS3). Estas proteínas no-estructurales quedan fuertemente unidas a las membranas del retículo endoplásmico y aparato de Golgi formando el complejo de replicación asociado a membranas, donde se desarrolla la replicación del material genómico.

Para ello, el ARN (cadena positiva) se utiliza como molde de una cadena anti-genómica (cadena negativa) a partir del cual se sintetizan las nuevas cadenas de ARN (cadena positiva), (Figura 5). De ello se encarga la proteína NS5B, que actúa como ARN-polimerasa ARN dependiente, actividad que es regulada por la proteína NS5A, pero también estaría implicado la proteína NS3 por su actividad ATPasa-helicasa.

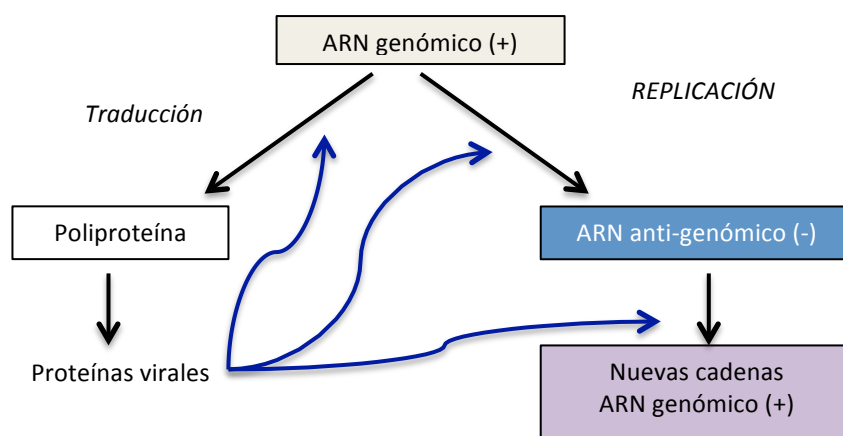


Figura 5 – ARN viral del VHC en el interior de la célula huésped

Las moléculas de ARN genómico neosintetizadas interaccionan con las proteínas del Core formando la nucleocápside al salir por gemación del retículo

endoplásmico. El virión se libera por el aparato de Golgi y sale nuevamente al exterior por exocitosis (19).

### **2.3. Variabilidad genética del Virus de la Hepatitis C**

El virus de la hepatitis C se caracteriza por una gran variabilidad genética. Esto es debido a la elevada cinética de replicación viral ( $10^{12}$  viriones/día en pacientes con infección activa) y a la alta tasa de mutación consecuencia de la falta de mecanismos correctores de los errores que se producen en el proceso de replicación (tasa de error de la ARN polimerasa dependiente de ARN de  $10^{-4}$ ).

De modo que en múltiples ciclos de replicación aparecen sustituciones de nucleótidos, que generan variantes con una homología superior al 98%, son las cuasiespecies. Esta variabilidad intragenómica hace que la población de virus que infecta a un individuo sea una mezcla muy heterogénea de genomas muy parecidos entre sí alrededor de una secuencia mayoritaria.

Estos errores en la replicación no afectan por igual a todas las regiones del ARN. Las regiones no-codificantes son las más conservadas. Las tasas de mutación más altas se encuentran en las regiones que codifican las glicoproteínas de la envuelta (E1 y E2/NS1), sobre todo en las regiones hipervariables HVR-1 y HVR-2.

Estos cambios en las regiones hipervariables supondrían modificaciones en la envoltura viral en la que probablemente se centre la respuesta del huésped, lo que permitiría al virus escapar de la respuesta inmunológica. Este hecho puede explicar la persistencia de la infección y su cronicidad, pero también está relacionado con la respuesta al tratamiento.

A lo largo de los años se han ido seleccionando las variantes más eficientes con una diversidad genética mayor. Son las variaciones intergenómicas: genotipos y subtipos.

Genotipos, si el grado de homología se encuentra entre 60-70% (20). Actualmente, se clasifican desde un punto de vista filogenético, según el modelo propuesto por Simmonds (20, 21) en 6 genotipos mayores (genotipo 1, 2, 3, 4, 5 y 6), aunque hay descritos hasta 11 distintos.

Dentro del mismo genotipo, se establecen subtipos con un grado de homología entre el 77-80%. Se han descrito más de 100 subtipos diferentes. Se designan con una letra que seguirá al número arábigo que denomina al genotipo (Figura 6).

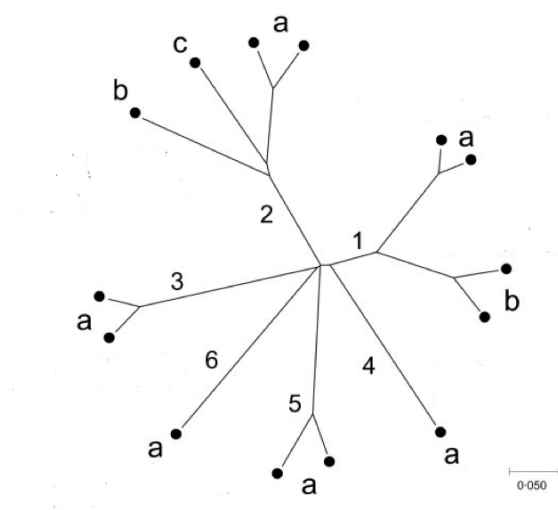


Figura 6 – Clasificación filogenética de los distintos genotipos y subtipos del VHC. Adaptado de Simmonds P. J Gen Virol. 2004 (20). Los genotipos se designan con un número arábigo. Los subtipos se designan con una letra

Existen infecciones mixtas en las que un paciente puede estar infectado por más de un genotipo o subtipo (21), generalmente, en relación con reinfección, ya que, para que pudiera presentar un cambio de subtipo desde el virus parenteral deberían pasar al menos 50-60 años.

En presencia de infecciones mixtas, una de las cepas suele prevalecer desplazando las otras, que pueden no ser detectadas aunque sí pueden influir en la respuesta al tratamiento.

No existía evidencia clara de recombinación en el VHC hasta el 2002, que se describe la primera cepa recombinante en San Petersburg (22). Desde entonces, se ha descrito recombinación entre distintos genotipos, entre subtipos del mismo genotipo e incluso entre cepas del mismo subtipo. Este mecanismo de variabilidad genética, aunque infrecuente, podría generar variantes de escape al tratamiento. La detección de cepas recombinantes es difícil, por lo que su incidencia podría estar subestimada (23).

### **3.- EPIDEMIOLOGÍA**

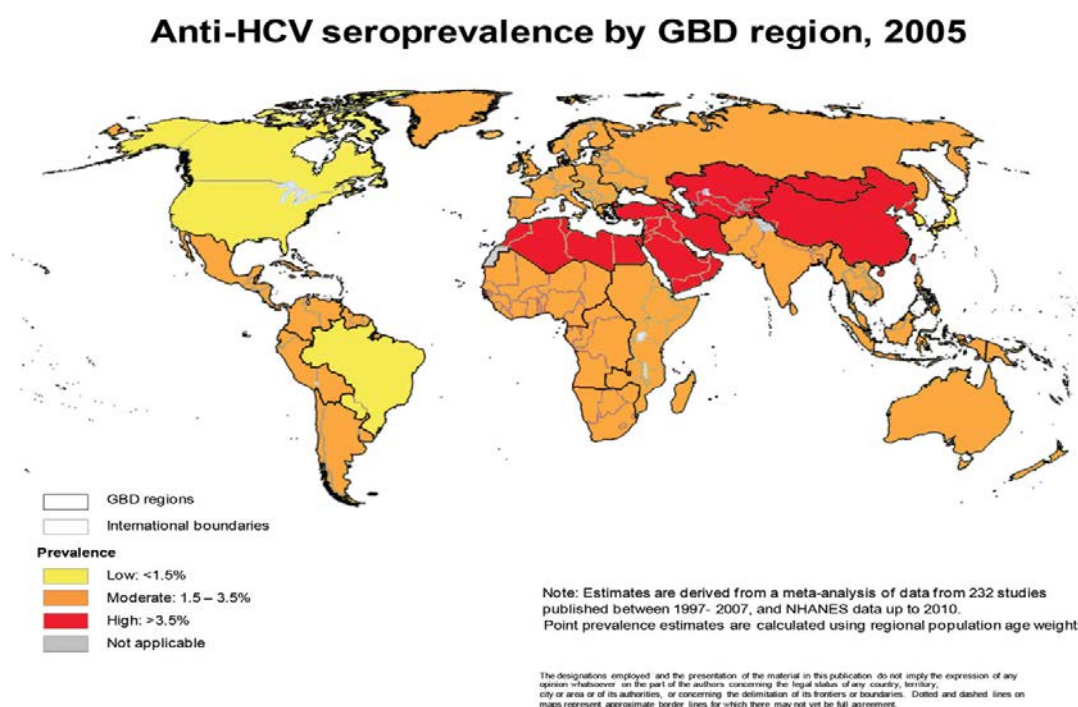
La infección por el VHC está extendida a lo largo de todo el mundo. Los datos epidemiológicos se basan en la detección de anticuerpos frente al virus (Ac anti-VHC), técnicas que se pusieron en marcha a partir de los años 90.

La incidencia de la infección es difícil de determinar. La mayoría de los casos de infección aguda son asintomáticos, y tienen un período ventana de seroconversión de 4-8 semanas, incluso se ha visto que un 10% de los casos no llegará a presentar anticuerpos. Por otro lado, ante una determinación de anticuerpos positiva en un paciente con serología previa desconocida, es difícil diferenciar entre infección aguda y crónica al carecer de marcadores de infección reciente.

Aunque no todos los países recogen los datos de manera sistemática, se estima que la prevalencia global de la hepatitis C está entre el 2,2% y el 3%, lo que supone que entre 130-170 millones de personas estarían infectados en el mundo (24, 25).

En un reciente estudio, Gower, y cols., analizando datos globales, encuentran diferencias entre la seroprevalencia, que estiman en el 1,6% (1,3–2,1%), y la prevalencia de la viremia, que estaría en el 1,1% (0,9–1,4%), (26).

Es una infección prevalente a nivel mundial pero con diferencias geográficas (Figura 7). Los datos más altos de prevalencia se encuentran en regiones de Asia (Este y Asia Central), Norte de África y en Oriente Próximo. En España y el resto de Europa se estima una prevalencia moderada entre 1,5-3,5% (25-27).



**Figura 7 – Distribución geográfica de la prevalencia de la infección por el VHC. Adquirido de Mohd Hanafiah, et al. Hepatology. 2013 (29)**

### 3.1.- Epidemiología y Genotipos

La distribución y prevalencia de los distintos genotipos y subtipos muestra igualmente variaciones geográficas (Figura 8). A nivel mundial es el genotipo 1 el más prevalente (46% de todas las infecciones), siendo el subtipo b el que se encuentra con mayor frecuencia.

Los genotipos 1, 2 y 3 están presentes en casi todas las regiones del mundo, aunque con una prevalencia variable. Los genotipos 1a y 1b son los predominantes en Europa y América. En Japón el genotipo 1b supone el 73% de las infecciones. El genotipo 3, el segundo más frecuente a nivel mundial (22%), es el responsable del 40% de las infecciones en Asia.

El 71% de las infecciones en el Norte de África y Oriente Próximo son debidas al genotipo 4, en relación con la alta prevalencia de Egipto. En Sudáfrica el genotipo 5 supone el 50% de las infecciones. El genotipo 6 se encuentra principalmente en Hong Kong y el Sudeste de Asia. Las infecciones mixtas se estiman entre el 4-17% (28, 30).



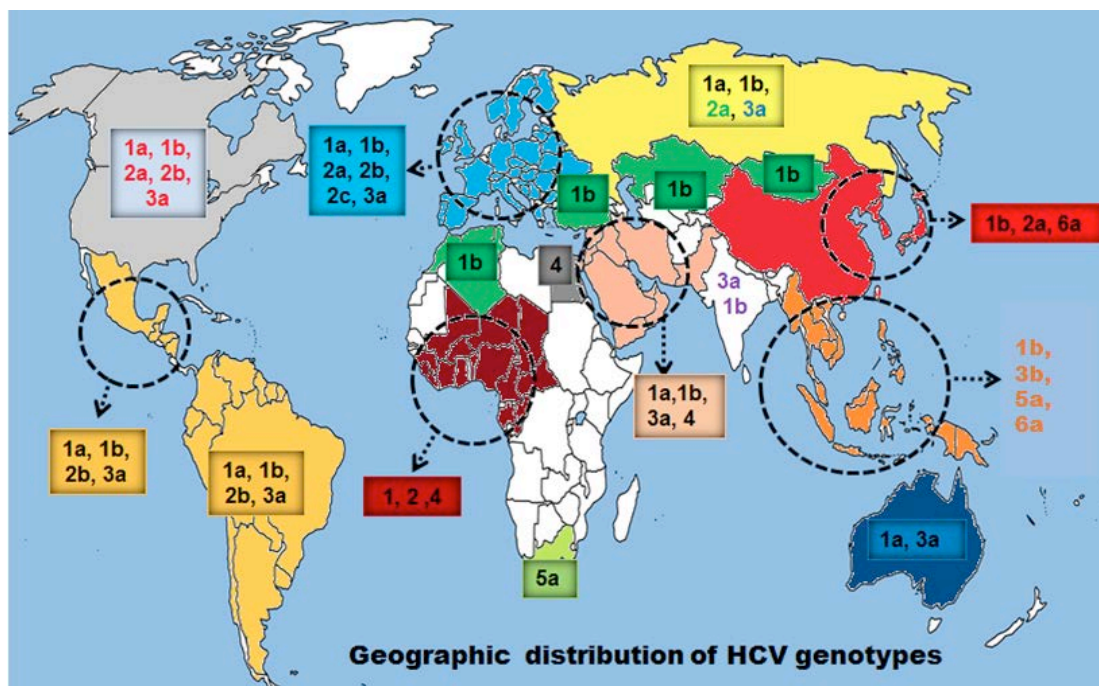


Figura 8 - Distribución geográfica de los genotipos del VHC. Adquirido de Hussain Z. Practical management of chronic viral hepatitis. 2013 (28)

Esta distribución y prevalencia de los distintos genotipos son consecuencia de los movimientos poblacionales y de la vía de transmisión: los genotipos 1a, 3a y 4 están relacionados con el uso de drogas por vía parenteral; y los genotipos 1b y 2 con el empleo de sangre o sus derivados contaminados y con procedimientos médicos (29).

### 3.2.- Situación en España

La incidencia real es difícil de conocer. Esto es debido en parte, a que en muchos casos la infección aguda pasa desapercibida. Por otro lado, la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica que recoge los datos relativos dentro de las Enfermedades de Declaración Obligatoria, lo hace bajo el epígrafe de “Otras hepatitis víricas” donde se incluyen además los casos de otras hepatitis noA-noB, con lo que es difícil establecer cuáles son los casos debidos al VHC. A esto se añade, en cierta medida, la infranotificación a los servicios de vigilancia.

Los últimos datos publicados por el Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III en 2014, reflejan que el número de casos declarados

como “otras hepatitis víricas” en 2013 (719 casos; 1,55 por 100.000) ha aumentado con respecto al año anterior (635 casos; 1,38 por 100.000), (30).

Los estudios de prevalencia revelan diferencias entre las diferentes comunidades autónomas y poblaciones estudiadas. Se considera que la prevalencia global en España oscilaría entre el 1 y el 2,6% (29, 31). En un último trabajo, Bruggmann, y cols. estiman la prevalencia en el 1,5% (1,2- 1,9%), lo que supondría que existen 702.000 personas infectadas en España. La mayoría de ellos presentan infección virémica (69%), con una prevalencia de infección activa, por tanto, del 1% (0,8-1,3%), (32).

En cuanto a los genotipos (Figura 9), y aunque se encuentran diferencias entre los distintos estudios, todos coinciden en que es el genotipo 1b el más frecuente en nuestro medio; y el genotipo 2 el que se encuentra más raramente (29, 31, 33). Actualmente, parece que el genotipo 1a sería el segundo en frecuencia, con una prevalencia superior al genotipo 3 (29).

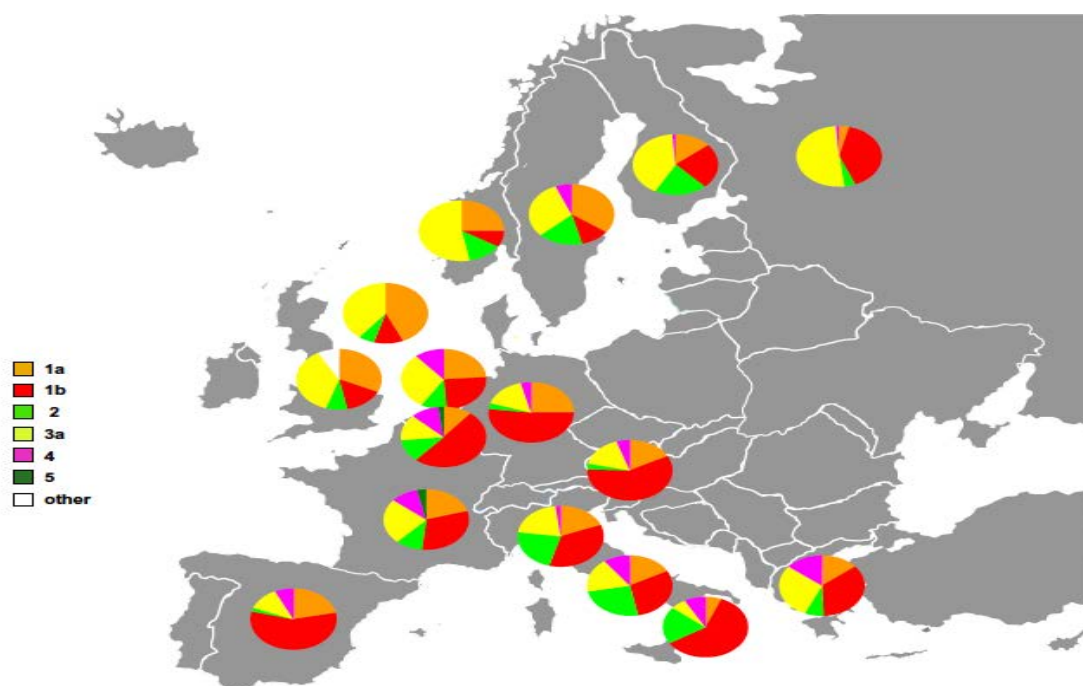


Figura 9 - Distribución de los genotipos del VHC en España y el resto de Europa. Adquirido de Esteban JI et al. J Hepatol. 2008 (29)

## 4.- VÍAS DE TRANSMISIÓN

Las distintas vías de contagio están en relación con el contacto con sangre, flúidos corporales o tejidos contaminados, directamente o a través de distintos materiales o equipos si no han sido suficientemente desinfectados.

### 4.1.- Transmisión relacionada con procedimientos médico-quirúrgicos

Hasta 1992, momento en el que se implementan las técnicas de cribado en los bancos de sangre, **la transfusión de sangre y hemoderivados** era la principal vía de contagio. Actualmente, el riesgo estimado es muy bajo (0,001%), sobre todo debido a la transmisión durante el período ventana entre la infección y la posibilidad de detección de los anticuerpos (29, 34-36).

En España, uno de los picos de prevalencia se encuentra en la población con más de 65 años, probablemente infectados por vía transfusional antes de la implantación del cribado (31).

Con la aplicación de medidas de control de la infección a los equipos de **hemodiálisis**, y la identificación de los pacientes infectados, la incidencia en las unidades de hemodiálisis ha disminuido. El riesgo de infección depende del tiempo de inclusión en el programa y del número de sesiones recibidas, siendo mayor en pacientes que recibieron hemodiálisis inmediatamente después de un caso infectado (34).

El **transplante** de órganos sólidos, médula ósea u otros tejidos de donantes infectados supone una posible vía de contagio, sobre todo, previo a las técnicas de cribado.

Se ha descrito también transmisión **nosocomial** en relación con procedimientos quirúrgicos y médicos invasivos, por el empleo de material contaminado (29, 37). En el momento actual, éste es uno de las principales mecanismos de transmisión. En este sentido, Martínez Bauer, y cols. refieren que puede representar el 73% de los casos diagnosticados en hospitales terciarios; mientras que Pérez-Álvarez, y cols. encuentran que el 40% de los 131 casos con hepatitis aguda diagnosticados en el período 1989-2010 pueden tener un origen nosocomial (36, 38).

#### **4.2.- Transmisión en usuarios de drogas por vía parenteral**

Debido al uso compartido de agujas y jeringas contaminadas, pero también por otros materiales de la preparación.

En los últimos años, se ha registrado una disminución progresiva del uso de drogas intravenosas, lo que ha hecho que la tasa de infección también haya ido disminuyendo, sin embargo, continúa siendo uno de los principales mecanismos de transmisión (29, 35, 39). Esta situación se corresponde con la encontrada en España (31, 40).

Es la subpoblación con una mayor tasa de infección: 60-80% de los consumidores de más de 5 años estarían infectados, se cree que con una incidencia anual en torno al 15-30% (34).

#### **4.3.- Transmisión Sexual**

Hay una gran controversia respecto a la eficacia de transmisión del VHC por vía sexual y las circunstancias en las que ocurre. Parece que la tasa de incidencia debida a transmisión sexual sería muy baja (0,07% al año), lo que supondría 1 de cada 190.000 relaciones sexuales (41).

Sería muy infrecuente en relaciones heterosexuales estables monógamas, sin embargo, en varones homosexuales con múltiples parejas, el riesgo es mayor. En estos últimos se ha observado un aumento en la incidencia y prevalencia (40-42).

El riesgo más alto de transmisión aparece cuando la persona infectada está en fase temprana de la infección aguda, ya que en ese momento la carga viral sería mayor y todavía no se habrían creado anticuerpos (35).

#### **4.4.- Transmisión vertical**

La transmisión vertical de madre a hijo, es el principal mecanismo de transmisión en la población infantil. Se estima que la tasa de transmisión es del 4-8% y ocurre cuando el ARN viral es detectable en el suero materno durante el parto (43, 44).

En España, la prevalencia en gestantes es similar a la encontrada en la población general. La tasa de transmisión vertical es baja (alrededor del 5%), sin embargo, el 90% de los niños infectados adquieren el virus por este mecanismo (45).

### **4.5.- Transmisión ocupacional**

Sobre todo en personal sanitario, suele ocurrir tras una punción accidental con material contaminado, con una tasa de seroconversión de 1,8%, dependiendo del tipo de material y de la profundidad de la punción. La transmisión a través de mucosas es rara, y no se han descrito casos de transmisión con sangre a través de piel intacta. La prevalencia de infección en el personal sanitario, no es superior, a la de la población general (34, 35).

### **4.6.- Otras vías de transmisión**

Se han relacionado otros mecanismos de transmisión plausibles que implicarían una potencial exposición inaparente al virus, tales como: tatuajes, “piercing”, acupuntura, algunos procedimientos cosméticos, la práctica de deportes de contacto, el consumo intranasal de drogas, e incluso, algunas prácticas religiosas como escarificaciones o la circuncisión (37, 46-48).

### **4.7.- Transmisión desconocida**

A pesar de ello, en ocasiones no se objetivan factores de riesgo reconocibles, con lo que no se puede establecer la vía del contagio. Los datos al respecto difieren entre los distintos estudios, con cifras que oscilarían entre el 10-54% en los distintos países europeos (29). En España, en el estudio publicado por Pérez-Álvarez, y cols., no se pudo establecer el mecanismo de contagio en el 17% de los casos (36).

## 5.- HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN

La historia natural no es del todo conocida por la dificultad de identificar el momento de la infección en la mayoría de los casos. El período de incubación, asintomático, puede variar de 2 semanas a 6 meses. La forma aguda tiene una forma de presentación bastante benigna pero con tendencia a la cronicidad y en algunos casos a la cirrosis y al hepatocarcinoma (Figura 10).

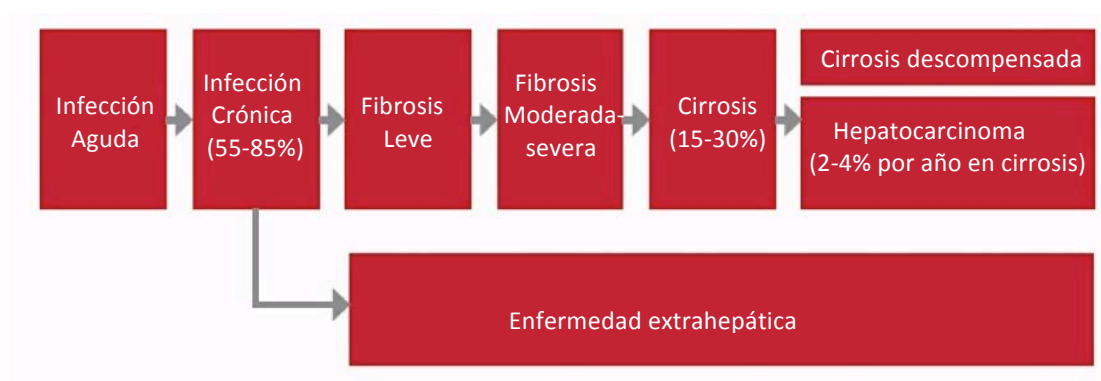


Figura 10 – Esquema de la historia natural de la Infección por el VHC. Modificado de WHO. Guidelines for screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection. 2014 (25)

### 5.1.- Infección Aguda por el VHC

Se cree que el 20% de las hepatitis agudas son debida a la infección por el VHC. El 80% de estas hepatitis son asintomáticas, por lo que el diagnóstico es difícil.

En los casos con sintomatología, ésta es inespecífica con malestar, anorexia, astenia, pérdida de peso, náuseas, artralgias, mialgias e incluso fiebre. Sólo el 25% de los casos son formas ictericas. La hepatitis fulminante o fracaso hepático agudo es excepcional.

La elevación de transaminasas (ALT y AST) aparece tras un período ventana de 4-12 semanas sin correlación lineal con la evolución de la enfermedad, pudiendo normalizarse aun cuando evolucione hacia la cronicidad o incluso no estar presente.

Aunque la viremia es detectable rápidamente, los anticuerpos no se detectan en suero hasta unas 10 semanas después de la exposición, pudiendo perdurar de manera indefinida.

Entre el 15-45% de los pacientes pueden presentar aclaramiento viral espontáneo y curación en los 6 meses siguientes. El restante 55-85% de los casos evolucionaría hacia la cronicidad (49, 50).

### **5.2.- Infección Crónica por el VHC**

En la mayoría de los casos, por tanto, hay una persistencia de la infección más allá de 6 meses. No está claro el mecanismo principal por el que el virus es capaz de permanecer en el organismo, aunque se han relacionado con múltiples factores.

Por parte del virus, la variabilidad genética y su rápida tasa de mutación facilitaría el escape al sistema inmunitario (51, 52).

Serían múltiples los factores del huésped, que podrían estar implicados. Entre ellos, el polimorfismo CC cercano al locus de la interleucina 28B (IL28BCC) sería uno de los más claramente implicados con la eliminación espontánea del virus (53). El sexo femenino (54), la presencia de los alelos HLA-DRB1 y DQB1 específicos (55, 56), títulos altos de anticuerpos neutralizantes contra las proteínas estructurales del virus (57) o el tener respuesta inmunológica precoz y potente de CD4 (58, 59), también estarían relacionados con una mayor probabilidad de aclaramiento viral.

Sin embargo, el tener más de 38 años, el abuso de alcohol, la coinfección por VIH u otros estados de inmunosupresión serían factores de riesgo hacia la cronicidad (60).

La mayoría de los pacientes que desarrollan infección crónica por el VHC, permanecen asintomáticos durante años. Las cifras de transaminasas suelen estar elevadas, aunque en el 10% de los casos se mantienen dentro de parámetros normales.

De presentar sintomatología, suele ser leve, como la descrita en la fase aguda de la enfermedad siendo lo más frecuente la astenia. Sin embargo, pueden aparecer otros síntomas en relación con la afectación extrahepática del virus.

Son múltiples las manifestaciones extrahepáticas que se han relacionado: Crioglobulinemia mixta, trastornos linfoproliferativos como el linfoma de Hodgkin, porfiria hepatocutánea tarda, liquen plano, afectación renal como glomerulonefritis

membranoproliferativa, diabetes mellitus tipo 2 o síndrome de resistencia a la insulina, síndrome de Sjögren, cuadros de artritis reumatoide-like o la producción de autoanticuerpos (61, 62).

Las complicaciones son debidas a la progresión del daño hepático a cirrosis, fallo hepático o hepatocarcinoma. Se estima que la tasa de progresión a cirrosis es del 15-30% en 20-30 años (63, 64).

Aunque los mecanismos que determinan la progresión del daño hepático no son bien conocidos, se han identificado múltiples factores que podrían estar implicados en el avance de la enfermedad.

La carga viral no influye en la progresión de la enfermedad, mientras que los datos relativos a los genotipos están poco claros. Aun así, el genotipo 1b entrañaría un mayor riesgo de desarrollar hepatocarcinoma (65), y el genotipo 3 parece que tiene una velocidad mayor de progresión de la fibrosis, probablemente por su asociación con esteatosis (60, 66, 67).

Se ha visto una progresión más rápida hacia cirrosis en coinfección por VHB (68). También en coinfección por VIH, con una mayor tasa de descompensaciones y hepatocarcinoma, sobre todo en situaciones de inmunodeficiencia avanzada (<200 CD4/mm<sup>3</sup>), (69).

De los factores dependientes del huésped, el sexo femenino y la edad joven se asocian a una menor progresión (67, 70, 71). Mientras que la persistencia de la actividad necroinflamatoria hepática (60), o la producción de citosinas profibrogenéticas (TGF- $\beta$ 1, angiotensina II), (72) se han asociado con un aumento de la fibrosis.

El polimorfismo cercano al locus de la interleucina 28B permite predecir la respuesta al tratamiento, pero en cuanto a su relación con la progresión de la fibrosis los datos no están claros (67, 73, 74). Recientemente, se han asociado polimorfismos únicos del nucleótido rs16851720 localizado en la región RFN7 que codifica una proteína antioxidante protectora de la apoptosis, y del rs4374383 que codifica factores implicados en la fagocitosis por macrófagos de células apoptóticas con la progresión de la fibrosis (75).



La esteatosis hepática, obesidad, resistencia a la insulina, hiperferritinemia y sobrecarga férrica hepática también se han relacionado con el avance de la enfermedad (60, 67, 76-78).

El consumo de alcohol promueve la replicación viral y acelera el daño hepático, incluso en consumos moderados en presencia de esteatosis (70, 79-82). El consumo de cannabis o de tabaco se han asociado con una mayor tasa de progresión de la fibrosis (83-86). Por otro lado, el consumo regular de café parece tener un efecto beneficioso (87, 88).

Una vez establecida la cirrosis, el curso clínico de la enfermedad es variable, pudiendo mantenerse estable durante años. Según avanza el grado de cirrosis pueden aparecer complicaciones propias de la hipertensión portal o de la insuficiencia hepática: Gastropatía y hemorragia digestiva por varices esofágicas, ascitis y peritonitis bacteriana espontánea, encefalopatía o síndrome hepatorrenal (89).

El riesgo de desarrollar hepatocarcinoma una vez que la cirrosis se ha establecido es del 2-4% al año (90). Este riesgo parece ser mayor si la infección es debida al genotipo 1b (65).

## **6.- DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO**

El diagnóstico precoz de la infección es fundamental para el control tanto de la enfermedad como de la transmisión. Aún así, como la infección presenta, generalmente, un curso asintomático puede pasar desapercibida y no diagnosticarse hasta estados avanzados.

El estudio de la infección del VHC se debe realizar cuando hay sospecha clínica y en pacientes asintomáticos pero con elevación persistente de transaminasas. Además, también se deben estudiar poblaciones de riesgo o con antecedentes de exposición. La OMS, recomienda realizar cribado en (25):

- Usuarios de drogas por vía parenteral
- Receptores de productos sanguíneos, sobre todo previo a la implementación del estudio a donantes
- Pacientes sometidos a intervenciones dentales o médicas invasivas en centros sin buen control de la infección
- Niños nacidos de madres infectadas por el VHC
- Parejas sexuales de pacientes infectados por el VHC
- Pacientes con infección por VIH
- Uso de drogas por vía intranasal
- Tatuajes, “piercing” o escarificaciones

Para el diagnóstico microbiológico se emplean técnicas indirectas y directas que permiten la detección de anticuerpos frente al VHC, antígenos o el ARN viral. El empleo secuencial de estas pruebas permite, además, discernir los estadios de la infección (Figuras 11 y 12), (93).

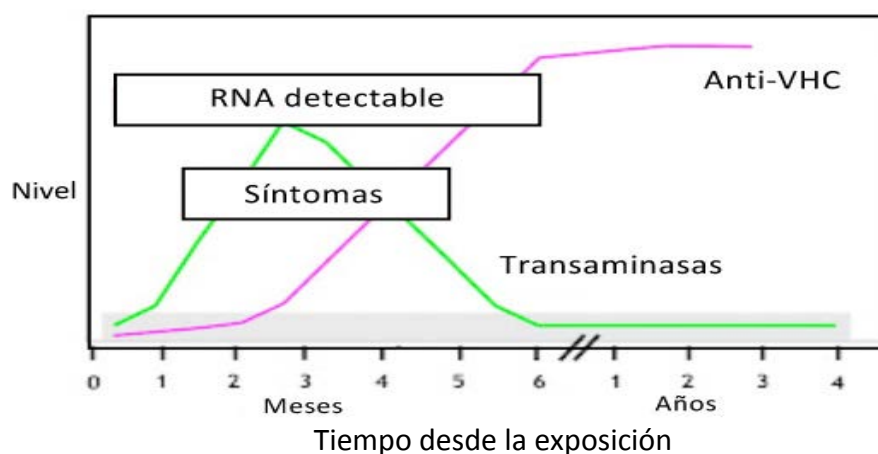


Figura 11 - Marcadores analíticos de la infección autolimitada por VHC. Adquirido de Aguilera et al. Procedimientos en Microbiología Clínica. SEIMC. 2014 (91)

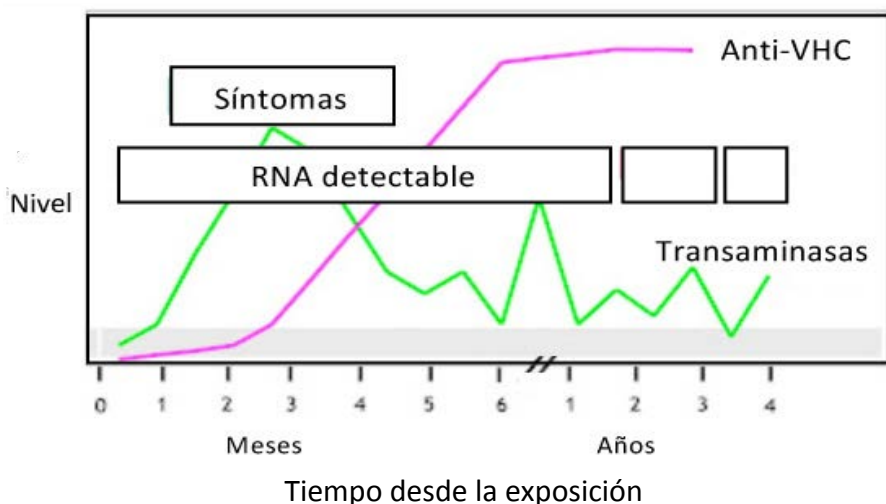


Figura 12 – Marcadores analíticos de la infección crónica por VHC. Adquirido de Aguilera et al. *Procedimientos en Microbiología Clínica. SEIMC. 2014 (91)*

### 6.1.- Técnicas indirectas

Se basan en métodos serológicos que estudian la respuesta inmune específica al VHC, mediante la detección de anticuerpos circulantes en sangre, constituyendo la primera línea diagnóstica.

No son útiles para el diagnóstico en las fases tempranas de la infección: En relación con el período ventana, la ausencia de anticuerpos no descartaría la infección.

Tampoco permiten discriminar entre infección activa o pasada. La respuesta humoral con inmunoglobulina IgM puede persistir incluso en infección crónica, por lo que no puede utilizarse, como en otros casos, como marcador de primoinfección.

En situaciones en las que hay una respuesta humoral reducida, como en la infección por VIH, transplantes u otros estados de inmunosupresión, o en pacientes en hemodiálisis la detección de anticuerpos puede ser limitada.

En recién nacidos de madres infectadas por el VHC, si se detectan anticuerpos éstos podrían ser de la madre.

En estas situaciones estaría indicada la determinación de ARN viral para poder establecer el diagnóstico.

### 6.1.1.- TÉCNICAS DE CRIBADO

En la actualidad se emplean técnicas de enzimoimmunoensayos (EIA) de tercera generación que permiten la detección de anticuerpos en suero o plasma frente a antígenos virales específicos (Core, NS3, NS4 y NS5). Estos antígenos virales obtenidos por ingeniería genética se exponen al suero del paciente, permitiendo la unión de los anticuerpos. La detección se realiza mediante una reacción colorimétrica o lumínica, en la variante quimioluminiscente (CLIA). Estos métodos tienen una sensibilidad y especificidad del 98 y 99%, respectivamente. Pueden presentar falsos positivos sobre todo en mujeres gestantes, en enfermedades autoinmunes, hipergammaglobulinemia o alteraciones metabólicas. Los falsos negativos están en relación con estados de inmunosupresión (92).

Existen pruebas de diagnóstico rápido basadas en inmunocromatografía que permiten la detección de anticuerpos en 30 minutos, a partir de muestras de suero, plasma, sangre e incluso exudados bucales (93).

### 6.1.2.- TÉCNICAS DE CONFIRMACIÓN

La inmunotransferencia con antígenos recombinantes o “inmunoblot” recombinante (RIBA y LIA) son técnicas más específicas que las de cribado. Identifican la reactividad a cada antígeno de forma independiente (91).

La muestra se incuba con una tira de celulosa o nylon sobre la que se han depositado los antígenos recombinantes. Los anticuerpos presentes en la muestra se fijarán a los antígenos específicos de cada banda. La lectura de los resultados se realiza mediante un sistema colorimétrico de detección enzimática, que revela la presencia de anticuerpos frente a cada determinante antigénico específico mediante la aparición de bandas de diferente intensidad y color.

Dada su buena especificidad se usan para la detección de falsos positivos con las técnicas de cribado, aunque están siendo desplazadas por la detección de ARN-VHC.

## 6.2.- Técnicas directas

Están basadas en la detección del virus o de distintos componentes virales.

### 6.2.1.- DETECCIÓN DEL ANTÍGENO DEL CORE DEL VHC

Se emplean técnicas de detección enzimática (EIA) o por quimioluminiscencia (CLIA). Se emplearían como alternativa a las pruebas de biología molecular, sobre todo cuando no se puede afrontar el coste de éstas. Incluso se ha propuesto el empleo para el seguimiento de los pacientes virémicos hasta su negativización, ya que al ser menos sensible en cargas virales bajas (no son reactivas por debajo de 5.000-10.000 UI/ml) sería necesaria la determinación de ARN-viral (96, 97).

### 6.2.2.- PRUEBAS MOLECULARES

- DETERMINACIÓN DEL ARN-VIRAL CIRCULANTE Y CARGA VIRAL

La detección de ARN del virus en plasma implica infección activa, y por tanto, capacidad infectiva. Sin embargo, un resultado negativo, no excluye totalmente la infección, el virus puede no estar circulante pero persistir en hepatocitos, macrófagos o linfocitos (98).

Permite el diagnóstico en fases muy tempranas de la infección, y diferenciar entre infección pasada o activa ante estudios serológicos positivos. Es un marcador diagnóstico fundamental en pacientes con alteraciones en la inmunidad humoral y en recién nacidos.

Además, la detección del ARN viral y su cuantificación es esencial para monitorizar la respuesta al tratamiento y valorar la erradicación del virus una vez finalizado el mismo.

Actualmente, se emplean técnicas de PCR a tiempo real que son rápidas y permiten rangos dinámicos amplios con una alta sensibilidad (15-10<sup>8</sup> UI/ml), (93).

- **GENOTIPADO**

La determinación del genotipo y subtipo es fundamental para valorar la pauta y el tiempo de duración del tratamiento y para estimar la respuesta al mismo.

Existen diversas técnicas para la determinación del genotipo. Las más empleadas se basan en la hibridación en reverso del producto amplificado por PCR con sondas genotipo-específicas. Se dispone también de técnicas de secuenciación de la región no-codificante 5'UTR o la región NS5B del genoma del virus (91).

## **7.- TRATAMIENTO**

El objetivo del tratamiento consiste en la erradicación del virus. El alcanzar respuesta viral sostenida (RVS), ausencia en plasma del ARN viral 6 meses después de haber finalizado el tratamiento, se considera predictor de la misma (97).

Conseguir la erradicación viral tiene efectos directos en cuanto a transmisibilidad, pero también, evita la progresión de la fibrosis hepática incluso con mejoría de las lesiones histológicas en muchos de los casos, disminuye la incidencia de descompensaciones de los pacientes cirróticos y de hepatocarcinoma. Lo que se traduce en una disminución de la morbi-mortalidad (60).

Todo paciente con enfermedad hepática sería candidato de tratamiento erradicador. También en infección aguda, ya que supone una mayor tasa de resolución de la infección que la obtenida espontáneamente.

Hasta hace poco, la combinación de interferón pegilado alfa 2a o 2b (peg-IFN), administrado semanalmente, con ribavirina (RBV) diariamente, constituía el tratamiento estándar, no sólo para el caso del genotipo 1b, sino para todos los genotipos.

Aunque con mejor respuesta que con otros regímenes previos, sólo se consigue RVS en el 40-50% de los casos de infección con genotipo 1, del 50-70% con

genotipo 4, del 60% con genotipo 5, del 60-80% con el 6, y algo mejores en los genotipos 2 o 3 (80%), (98-102).

Interferón-alfa es una citocina con efectos antivirales, antiproliferativos e inmunorreguladores. Actúa sobre receptores de membrana de los hepatocitos, lo que inicia la transducción de señales intracelulares (Jak-STAT) induciendo la transcripción de genes estimulados por el interferón (ISGs) que codifican proteínas que interfieren en el ciclo celular e inhiben la replicación viral (Figura 13). Pero además, el interferón tiene efecto sobre el sistema inmune con activación de las células “natural-killer”, maduración de células dendríticas y proliferación de linfocitos T (103).

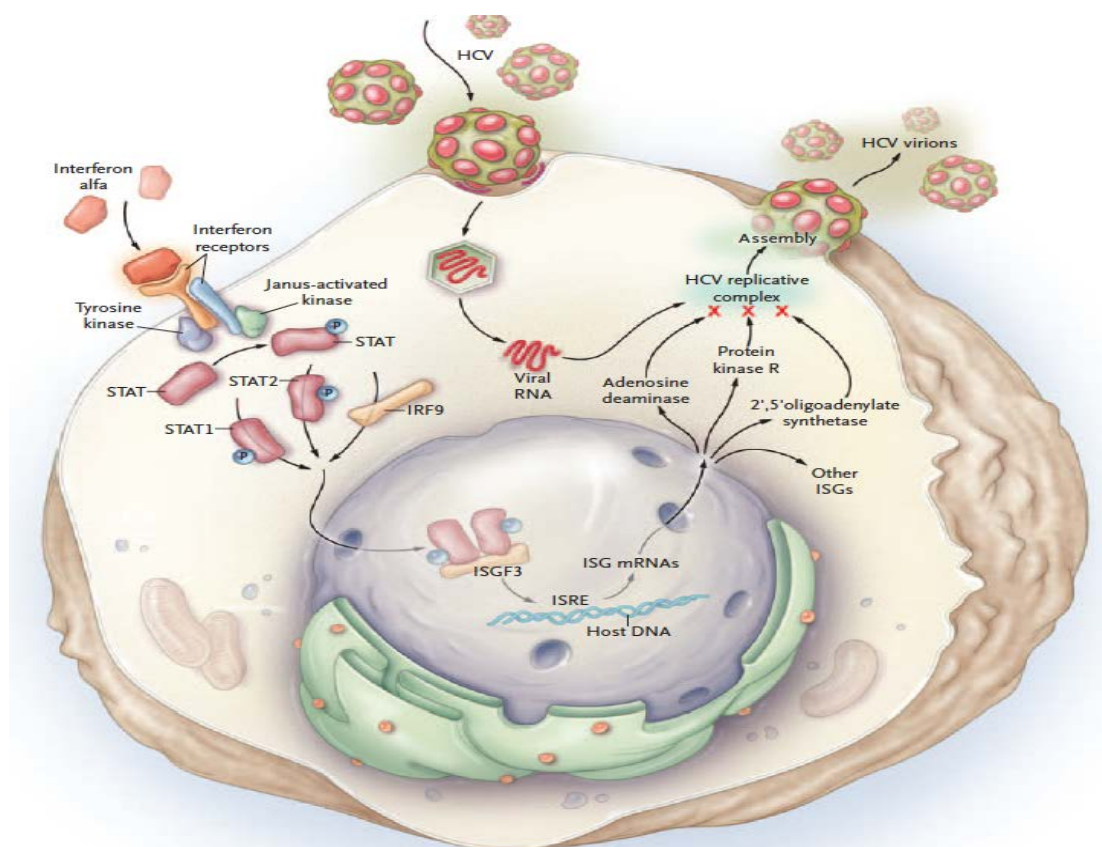


Figura 13 – Mecanismo de acción del interferón-alfa en los hepatocitos. Adquirido de Hoofnagle et al. *N Engl J Med.* 2006 (103).

Peg-IFN, en sus dos formas, alpha-2a y alpha-2b, se obtiene al unir cadenas ramificadas de polietilenglicol a la molécula de interferón; con lo que se disminuye el metabolismo del fármaco aumentando su biodisponibilidad y mejorando así, su acción antivírica.

RBV es un nucleósido análogo de la guanina. No se conoce bien cuál es el mecanismo de acción en el VHC. Parece que podría estar relacionado con la inducción de mutaciones en el ARN, con efecto sinérgico en su administración conjunta con el IFN. En monoterapia no tendría capacidad para erradicar el virus (104, 105).

Son muchos los efectos secundarios derivados del tratamiento, sobre todo debidos al IFN, ya que RBV es mejor tolerada. Con mayor frecuencia aparece un síndrome pseudogripal con malestar general, fiebre, mialgias y cefalea. Otros como, cuadros de depresión y/o ansiedad, alteraciones hematológicas (anemia, trombocitopenia o neutropenia) o astenia pueden ser especialmente severos. También se han descrito síntomas respiratorios, náuseas, alteración en el metabolismo de la glucosa, disfunción tiroidea, manifestaciones cutáneas u oftalmológicas, exacerbación de enfermedades autoinmunes o sarcoidosis.

El éxito del tratamiento depende en cierta medida del cumplimiento y la aparición de estos efectos secundarios puede llevar al abandono o a la necesidad de suspenderlo por intolerancia en el 15-25% de los casos.

Por otro lado, supone que en situaciones de depresión, psicosis o epilepsia no controlada, enfermedades médicas severas (EPOC, cardiopatía, enfermedad cerebrovascular, enfermedades malignas), enfermedades autoinmunes y hepatopatía crónica descompensada estaría contraindicado.

El embarazo también sería una contraindicación debido a que la RBV es teratogénica, debiéndose emplear contracepción hasta 6 meses después de finalizar el tratamiento tanto en varones como en mujeres.

Dada la pobre respuesta al tratamiento, sobre todo, en el genotipo 1, y los múltiples efectos secundarios derivados del mismo, se ha indagado en marcadores pronósticos de respuesta, para individualizar la indicación y la pauta de tratamiento. En este sentido, se han descrito diversos factores basales que podrían estar relacionados con la respuesta:



- **Genotipo:** De los factores dependientes del virus, el genotipo es el que más claramente se ha relacionado con la respuesta al tratamiento. Aquellos con genotipo 1 ó 4 tendrían menos probabilidad de alcanzar RVS (98-102).
- **El estadio de fibrosis** es el principal marcador dependiente del huésped. Estadíos de fibrosis avanzada o cirrosis tienen una peor respuesta. Por tanto, éste debe ser valorado ya sea mediante biopsia o por métodos indirectos (106, 107).
- **La carga viral basal** es otro de los principales marcadores de RVS: Numerosos estudios encontraron tasas de RVS más elevadas en relación con cargas virales basales más bajas (< 400.000-800.000 UI/ml), (107-111).
- **Diversidad genética:** Un fuerte factor de predicción en el genotipo 1 es el polimorfismo en el gen IFNL3 que codifica la interleucina 28B. Los portadores del genotipo favorable (CC) en rs12979860 tienen 2 veces más posibilidades de alcanzar la RVS que con los genotipos no-favorables (CT o TT). Este polimorfismo podría explicar las diferencias encontradas entre las distintas etnias: Las poblaciones asiáticas, donde el genotipo CC es más prevalente, son las que mejor respuesta al tratamiento presentan; mientras que las poblaciones de origen africano, con menor frecuencia de CC, tienen una peor respuesta. Por otro lado, el alelo G en rs8099917 (GT o GG) está asociado como factor predictivo de no-respuesta. El estudio conjunto de ambos polimorfismos tendría una mayor capacidad de predicción (112, 113).
- **La edad:** Numerosos estudios encuentran mayores tasas de RVS en pacientes más jóvenes (<41 años), (108, 110, 114-116).
- La **resistencia a la insulina**, el **índice de masa corporal**, la **hipertensión portal** (>10 mmHg.) y la **esteatosis hepática** estarían relacionados con el fracaso (98, 116-118).

Se han estudiado otros muchos factores que pueden influir en la respuesta pero con menor impacto: Niveles de triglicéridos, de lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL), de vitamina A y D, o el consumo de café, entre otros.

Recientemente se ha visto que los anticuerpos anti-VHC E1E2, o el polimorfismo TT/ $\Delta$ G (ss469415590) también podrían ser utilizados como marcadores (119-121).

Sin embargo, ninguno de ellos es capaz de proporcionar predicciones fiables. La marcada variabilidad genética del virus con la presencia de cuasiespecies y determinados polimorfismos genéticos en regiones estructurales y no-estructurales del VHC podrían explicar el escape a los efectos antivirales del peg-IFN y RBV. El conocimiento de estas mutaciones permitiría conocer la probabilidad de respuesta antes de iniciar el tratamiento (23, 122).

## 7.1. Nuevos tratamientos

Los avances de los últimos años en el conocimiento del VHC a nivel molecular han permitido el desarrollo de nuevos agentes antivirales de acción directa (AAD), que bloquean diferentes vías en la replicación y ensamblaje del virus (Figura 14).

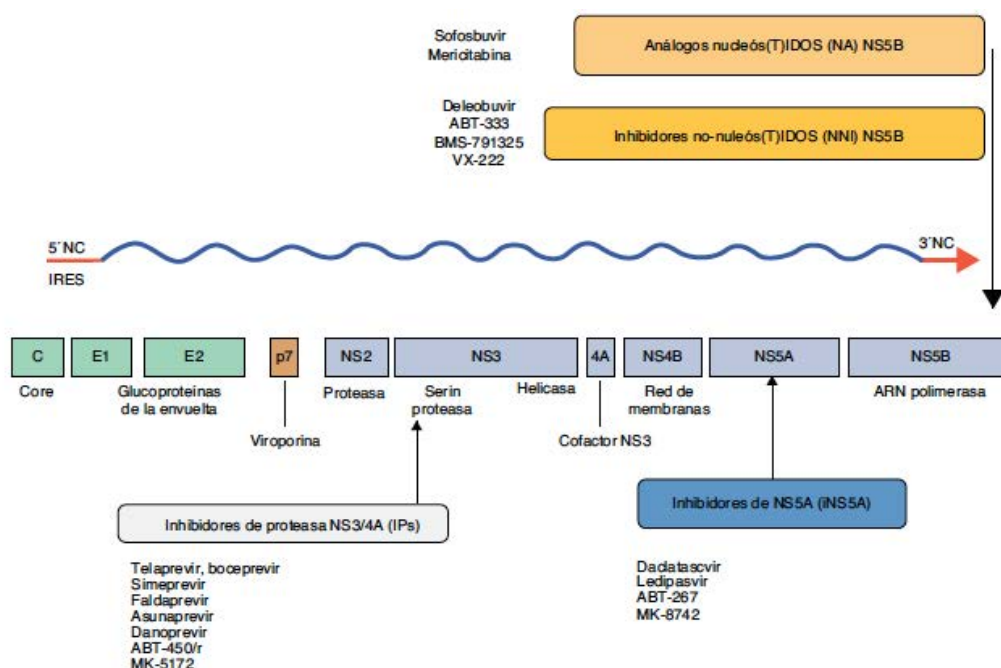


Figura 14 – Mecanismo de acción de diferentes antivirales de acción directa. Adquirido de Lens, S. Gastroenterol Hepatol. 2014 (123). ABT-450/r (Paritaprevir/Ritonavir), ABT-267 (Ombitasvir), ABT-333 (Dasabuvir)

Los inhibidores de la proteasa NS3 de primera generación, **telaprevir** y **boceprevir** fueron los primeros de estos AAD empleados en el tratamiento de la infección por el genotipo 1. En triple terapia junto con peg-IFN y RBV mostraron un incremento significativo de las tasas de RVS (124-127), pero con una peor tolerancia, sobre todo con efectos hematológicos (anemia y neutropenia) y cutáneos (128, 129).

Posteriormente se incorporaron otros nuevos antivirales en asociación con peg-IFN y RBV: **sofosbuvir** (inhibidor de la ARN polimerasa dependiente de ARN NS5B), **simeprevir** (inhibidor específico de la serin-proteasa NS3/4A) y **daclatasvir** (inhibidor de la proteína no estructural NS5A). Estas pautas, en general, son mejor toleradas, sin añadir una mayor toxicidad debida al tercer fármaco, aunque simeprevir es fotosensible habiéndose descrito reacciones cutáneas graves.

Los tres regímenes son eficaces para el tratamiento de genotipo 1b, sobre todo en pacientes naïve, con tasas de RVS de hasta el 87%, pero menores en pacientes no respondedores a tratamientos previos. Sin embargo, para genotipo 1a los resultados son subóptimos con daclatasvir, y en el caso de simeprevir si está presente el polimorfismo Q80K en la región NS3/4A asociado con bajas tasas de RVS (58%) en este subtipo (130-139).

### 7.1.1- PAUTAS LIBRES DE IFN:

Salvo en el caso de **sofosbuvir** con **ribavirina** que presenta resultados subóptimos para este genotipo (130, 140), son pautas eficaces tanto en pacientes naïve como en aquellos con historia de fracaso terapéutico en el genotipo 1b. En general, con buena tolerancia evitando la toxicidad debida al IFN.

La combinaciones de **sofosbuvir** con **simeprevir** o **daclatasvir**, muestran altas tasas de RVS, superiores al 90%, incluso en pacientes con fracaso previo. Aunque no se ha demostrado una mayor eficacia, se podría asociar además RBV en las situaciones en las que se prevé una peor respuesta (130, 141, 142).

La combinación de **ledipasvir** administrado con **sofosbuvir** en dosis fija, y de **ombitasvir-paritaprevir-ritonavir** con **dasabuvir**, asociadas o no a RBV, son muy efectivas en pacientes naïve o con antecedentes de fracaso y en cirrosis, alcanzando RVS variable (95-100% en genotipo 1b), (143-148).

La incorporación de estas nuevas moléculas ha supuesto una revolución en el tratamiento de la hepatitis por el VHC. A pesar de ello, el estudio de los marcadores de respuesta analizados en nuestro trabajo podría seguir teniendo utilidad, no sólo en la biterapia con peg-IFN y RBV, sino cuando se utilicen antivirales cuyo mecanismo de acción implique alguna de las regiones estudiadas.

## II.Objetivos

La infección por el VHC constituye un problema de salud pública en España y a nivel mundial dada su prevalencia. Además, la historia natural de la infección supone la evolución hacia la cronicidad en la mayoría de los casos considerándose una de las principales causas de cirrosis, enfermedad hepática terminal y hepatocarcinoma, lo que origina una importante morbi-mortalidad.

En el momento de desarrollo de este estudio, el tratamiento estándar estaba basado en la combinación de peg-IFN con RBV, con el que se conseguían unas tasas de RVS variable en función del genotipo; siendo el genotipo 1 y más específicamente el subtipo b, el que presentaba una peor respuesta. A su vez, este genotipo 1b es el más prevalente a nivel mundial y en nuestro medio.

Este tratamiento induce con frecuencia efectos secundarios, incluso graves, lo que conlleva una merma en la calidad de vida y la necesidad de suspender el tratamiento en algunos casos.

Con el fin de seleccionar a aquellos pacientes que pudieran tener una respuesta favorable y beneficiarse del tratamiento, se han estudiado múltiples factores que permitieran predecir la respuesta al mismo antes de su inicio. Sin embargo, ninguno ha sido capaz de proporcionar datos fiables ante un paciente concreto.

Determinados polimorfismos genéticos en regiones estructurales y no-estructurales del VHC podrían explicar el escape a los efectos antivirales del peg-IFN y RBV, pudiendo emplearse, por tanto, como marcadores de respuesta.

Se ha identificado una región denominada “Interferon Sensivity-Determining Region” (ISDR), que abarca entre los aminoácidos 2209 y 2248 de la región que codifica la proteína no-estructural NS5A. Las mutaciones en esta región se relacionan con la respuesta al tratamiento con IFN en monoterapia y, en biterapia en combinación con RBV, en la infección por el genotipo 1b. Esta relación se ha encontrado en población japonesa, con resultados más controvertidos en Europa y EE.UU.

Diversas mutaciones en la región codificante de la proteína del Core se han relacionado con una peor respuesta en población japonesa con infección por el

genotipo 1b, con lo que también tendrían un papel como predictor de fallo terapéutico.

El estudio de la variabilidad genómica de estas dos regiones permitiría mejorar los modelos predictivos aumentando la fiabilidad de los mismos.

A pesar de las expectativas de curación con las nuevas terapias, es de interés conocer las características genómicas de estas dos regiones, no sólo por su implicación pronóstica en la respuesta a la biterapia con peg-IFN y RBV sino también por su posible papel en los nuevos avances terapéuticos .

En este contexto, se ha desarrollado el presente trabajo de Tesis Doctoral con los siguientes objetivos:

1. Caracterizar a nivel genómico la región codificante de la proteína C del Core en los pacientes con infección crónica por el genotipo 1b en nuestro medio, y analizar la prevalencia de las mutaciones encontradas.
2. Caracterizar a nivel genómico la región ISDR de la región codificante de la proteína no-estructural 5A (NS5A) en los pacientes con infección crónica por el genotipo 1b en nuestro medio, y analizar la prevalencia de las mutaciones encontradas.
3. Analizar el impacto de la variabilidad genómica de la región del Core en la respuesta al tratamiento con interferón pegilado y ribavirina en los pacientes con infección crónica por el genotipo 1b en nuestro medio.
4. Analizar el impacto de la variabilidad genómica de la región ISDR de la región NS5A en la respuesta al tratamiento con interferón pegilado y ribavirina en los pacientes con infección crónica por el genotipo 1b en nuestro medio.

Este proyecto involucra, además, otros objetivos particulares:

- Analizar otros factores basales implicados en la respuesta a la biterapia: edad, sexo y carga viral basal, en los pacientes con infección crónica por el genotipo 1b en nuestro medio.



### III. Material y métodos

## 1. DISEÑO DEL ESTUDIO

### 1.1. Tipo y ámbito del estudio

Se diseñó un estudio prospectivo que permitiera valorar el impacto pronóstico de las mutaciones encontradas tanto en la región codificante de la proteína C del Core como en la proteína no-estructural 5A (NS5A), y a su vez conocer las características genómicas de ambas regiones en nuestra población.

El estudio se realizó entre Enero del 2011 y Septiembre del 2012 en el Servicio de Microbiología Clínica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid (HCSC).

### 1.2. Selección de la muestra a estudio

Los pacientes seleccionados habían sido remitidos para diagnóstico desde el Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Se trataba de pacientes con infección crónica por el virus de la hepatitis C genotipo 1b. Un total de 70 pacientes a los que se les había realizado estudio de anticuerpos, viremia y genotipado fueron incluidos.

- DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-VHC

Se empleó el sistema ADVIA-Centaur®(Siemens Diagnostics) para la detección de anticuerpos IgG frente al VHC en el suero. Consiste en un inmunoensayo indirecto de tipo sándwich de doble lavado que detecta la presencia de anticuerpos frente a antígenos del VHC recombinantes: c200 (procedente de las secuencias NS3 y NS4), NS5 y c22 (un péptido sintético del Core). El analizador automático mide la cantidad de luz emitida durante la reacción quimioluminiscente. Se considera negativo, cuando el valor índice es <0,80 y positivo cuando es  $\geq 1$ . Entre 0,80 y 1,19 se considera indeterminado.

Para la confirmación de los resultados positivos o indeterminados, se empleó el test CHIRON®RIBA®HCV 3.0 SIA. Es un enzimoimmunoensayo cualitativo *in vitro* que permite la detección de anticuerpos frente a antígenos específicos del VHC. Emplea dos antígenos recombinantes

codificados (c33c y NS5), dos péptidos sintéticos de regiones putativas no-estructurales (c100p y 5-1-1p) y otro péptido sintético de la proteína putativa de la nucleocápside (c22p). También se incluye una banda de superóxido dismutasa humana recombinante (SODh) de control que permite la detección de anticuerpos que no son específicos para las porciones codificadas de los antígenos recombinantes del VHC. Estos antígenos están inmovilizados como bandas individuales en las tiras de la prueba, junto con dos bandas de control interno (control bajo, nivel I y control alto, nivel II de IgG humana).

Las tiras se incuban con la muestra permitiendo, si hay anticuerpos, que éstos se fijen a las correspondientes bandas. La visualización de la reactividad de los anticuerpos anti-VHC con las proteínas fijadas en la membrana se logra utilizando un conjugado enzimático de anti-IgG humana junto con un sustrato enzimático colorimétrico.

La reactividad de cada banda se determina visualmente comparando su intensidad con la de las bandas del control interno de cada tira. La interpretación de los resultados (NEGATIVO, INDETERMINADO, POSITIVO) se basa en el patrón de reacción presente en la tira, según las indicaciones del fabricante.

- **CARGA VIRAL:**

La detección y cuantificación del ARN-VHC se determinó mediante PCR a tiempo real con el sistema COBAS®AmpliPrep/COBAS®TaqMan®HCV Test (Roche).

Es una prueba de amplificación para la determinación cuantitativa del ARN del VHC. Este proceso se realiza en distintos pasos fundamentales:

1. Extracción del ARN del VHC:

El ARN viral se extrae de plasma o suero del paciente mediante la lisis de las partículas virales. El ARN liberado se une a la superficie de partículas magnéticas de vidrio, lo que permite la separación del ARN del resto de elementos séricos que serán eliminados por procesos de lavado.

2. Transcripción reversa de una zona conservada del ARN para generar un ADN complementario (ADNc).
3. Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADNc y detección simultánea (PCR en tiempo real) mediante una sonda de detección oligonucleótida.

La reacción de transcripción reversa y la amplificación se lleva a cabo con la enzima termoestable ADN polimerasa de *Thermus specie* (Z05). Esto permite que ambos procesos junto con la detección tengan lugar en tiempo real de amplificación.

La secuencia a amplificar que se selecciona por los cebadores, corresponde a regiones del genoma del HCV que presentan una máxima conservación entre los distintos genotipos.

El uso de sondas fluorescentes doblemente marcadas permite detectar en tiempo real la acumulación de productos de la PCR monitorizando la intensidad de emisión durante el proceso de amplificación.

La cuantificación es posible al incluir en cada muestra un número de copias conocido del QS del VHC que se añade al inicio a cada muestra y se somete junto al ARN objetivo a todos los pasos del proceso. La concentración de ARN del VHC presente en las muestras se calcula comparando ambas señales.

Esta técnica permite detectar el ARN de VHC cuando está presente en concentraciones desde 15 UI/ml hasta 6,90E+07 UI/ml.

- GENOTIPADO DEL VHC

Se empleó el método de diagnóstico *in vitro* VERSANT®HCV Genotype 2.0 LiPA (Siemens Diagnostics), que identifica el genotipo y subtipo del virus en muestras de plasma o suero.

Tras un primer paso de extracción del ARN viral, se realiza una RT-PCR, con la obtención de ADN complementario (ADNc) mediante

transcripción inversa a partir del cual se co-amplifican partes de las regiones 5'UTR y Core, por medio de dos pares de iniciadores.

Estos dos fragmentos se hibridan con sondas de oligonucleótidos específicas de las regiones 5'UTR y Core de los diferentes genotipos, inmovilizadas en una tira de nitrocelulosa. El revelado se logra utilizando estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina como conjugado junto con un sustrato cromógeno, que da lugar a un precipitado de color marrón que permite ver el patrón de bandas de la tira.

La determinación del genotipo se realiza con la lectura de los patrones de bandas obtenidos, comparándolos con los proporcionados por el fabricante.

### 1.2.1.- SELECCIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ESTUDIO DEL IMPACTO EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.

Todos los resultados serológicos, de carga viral y genotipado fueron remitidos, como corresponde, al médico prescriptor, quien indicó tratamiento con peg-IFN y RBV a 42 pacientes según las recomendaciones vigentes en ese momento, y realizó el seguimiento, informándonos de los datos de respuesta al mismo.

Con los datos de respuesta así obtenidos, de los 42 pacientes tratados, se excluyeron 3 casos: Dos casos presentaron intolerancia suspendiéndose el tratamiento, y el otro caso por falta de seguimiento. Los 39 casos restantes fueron seleccionados.

Aquellos que habían alcanzado respuesta viral sostenida (RVS), ausencia de ARN-VHC en plasma a las 24 semanas tras haber completado el tratamiento, se incluyeron dentro del grupo de respondedores. De no ser así, se consideró fracaso al tratamiento o falta de respuesta.

## 2.- PROTOCOLO DE ESTUDIO

De los 70 pacientes, se recogieron para su estudio datos demográficos (edad, sexo y nacionalidad), datos relativos a la carga viral basal y, en aquellos que siguieron tratamiento su respuesta al mismo. En todos ellos se secuenció la región del Core entre los aminoácidos 45-125 y la región NS5A entre los aminoácidos 2200-2260.

### 2.1.- Estudio de la región del Core:

#### 2.1.1.- SECUENCIA DE REFERENCIA

Se obtuvo una secuencia salvaje de la región del Core del VHC genotipo 1b como secuencia de referencia para determinar las mutaciones. Esta secuencia se adquirió de la base de datos del GenBank del NCBI, “National Center for Biotechnology Information”, ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)).

Se buscaron las regiones donde aplican los cebadores descritos por Akuta, y cols. (149):

- CC11: 5'-GCC ATA GTG GTC TGC GGA AC-3'
- CC9: 5'-GCT AGC CGA GTA GTG TT-3'.
- E14: 5'-GGA GCA GTC CTT CGT GAC ATG-3' (antisentido)

Y se programó el secuenciador OpenGen®System de Siemens con la secuencia comprendida entre los nucleótidos 133-375 que se corresponde con los aminoácidos 45-125, así determinada (Figura 15).

```
GGTGTGCGCGGACAAGGAAGACTTCGGAGCGGTCCCAGCCACGTGGAAGGCGCCA
GCCCATCCCTAAAGCCCGGCGCCCCGAGGGCCGAACCTGGGCACAACCAGGATACCC
CTGGCCCTATACGGGAATGAGGGACTCGGCTGGGCAGGATGGCTCCTGTCCCCCG
AGGTTCCCGTCCCTCTTGGGGCCCCACTGACCCCGGCATAGGTCGCGCAACGTGGG
TAAGGTCATCGATACC
```

Figura 15 - Secuencia de referencia de la región del Core (133-375 nt.)

### 2.1.2.- CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE LA REGIÓN DEL CORE

El estudio de la variabilidad genómica de esta región se determinó mediante secuenciación directa, tras la extracción del ARN viral y de la amplificación por RT-PCR. Para ello se diseñó un protocolo basado en los trabajos de Akuta, y cols. y la Guía TRUGENE de Siemens Healthcare Diagnostics (149, 150).

Los cebadores se solicitaron específicamente al laboratorio TIB<sup>®</sup>MOLBIOL Syntheselabor GmbH donde fueron sintetizados. El laboratorio Siemens Healthcare Diagnostics suministró las enzimas, desoxinucleótidos, terminadores, soluciones tampón, agua libre de RNAasa, inhibidor de RNasa y ditiotritol.

#### 2.1.2.1- Extracción del ARN viral

Se empleó el ARN viral que había sido extraído para la determinación de la carga viral mediante el método comercial COBAS<sup>®</sup>AmpliPrep (Roche).

#### 2.1.2.2.- Amplificación

La amplificación se realizó mediante una RT-PCR seguida de una PCR semianidada.

1. **Preparación de reactivos:** Los cebadores se prepararon previamente según indicaciones del fabricante (Protocolo 1).

#### Protocolo 1 – Preparación de los cebadores de las dos reacciones de amplificación de la región del Core

##### **Preparación de Primers para RT-PCR y Hemi-nested PCR:**

Añadir el volumen indicado de agua libre de Dnasas a cada primer según Synthesis Report para obtener una concentración de 100  $\mu$ M (100 pmoles/ $\mu$ l)

Hacer alicuotas de primer a 20  $\mu$ M (20 pmoles/ $\mu$ l). Dilución 1/50.

Ej: 10 $\mu$ l de primer +490  $\mu$ l de agua libre de DNAsas. Alicuotar en 10 tubos de 50  $\mu$ l cada uno.

(CC11: 253  $\mu$ l, CC9 193 $\mu$ l y E14 230 $\mu$ l)

2. **RT-PCR:** Se realizó la retrotranscripción del ARN viral con la obtención de un ADN complementario (ADNc), que servirá de base para la amplificación mediante PCR de la región comprendida entre los cebadores CC11 Y E14. Para ello, se siguió el protocolo 2:

Protocolo 2 – RT-PCR de la región del Core. Modificado de Siemens Healthcare Diagnostics (150)

## RT-PCR

### Área 1 (limpia) Preparación de reactivos (campana 1)

#### TODAS LAS MEZCLAS DEBEN SER PREPARADAS EN HIELO

- ☐ Descongelar a Tª ambiente los reactivos (H2O, Primers, dNTP, DTT y RT-PCR Bufer) luego Vortear (pulso de centrifuga si fuera necesario) y pasarlos a hielo.
- ☐ Las **enzimas RT ENZ, DNA POL y RNasa IN** pasan a hielo directamente y no se vortean, se mezclan con pipeta antes de ser dispensadas.
- ☐ Preparar la RT-PCR MASTER MIX I en un tubo de 1,5 ml.

Nº. Reacciones	1	2	3	4	5	6	7	8
H2O Rnases free	12,8	25,6	38,4	51,2	64	76,8	90	102
CC11	1,2	2,4	3,6	4,8	6	7,2	8,4	9,6
E 14	1,2	2,4	3,6	4,8	6	7,2	8,4	9,6
dNTP	1,8	3,5	5,3	7	8,8	10,5	12	14
DTT	1,2	2,4	3,6	4,8	6	7,2	8,4	9,6
Rnase-In	0,6	1,2	1,8	2,4	3	3,6	4,2	4,8

18,8 Volumen en µl

#### VORTEAR LA MASTER MIX I LIGERAMENTE ANTES DE DISPENSARLO

- ☐ Alicuotar 16 µl de la RT-PCR Master Mix I en el fondo de cada tubo de PCR de 0,2 ml (uno por muestra)

#### MANTENER LOS TUBOS EN HIELO

- ☐ Preparar la RT-PCR MASTER MIX II en un tubo de 1,5 ml. Mezclar con la pipeta la RT ENN, DNA POL y RNasa IN antes de dispensarlo.

Nº. Reacciones	1	2	3	4	5	6	7	8
RT-PCR Buffer 1	11,7	23	35,1	46,8	58,5	70,2	81,9	93,6
Rnase-In	0,6	1,2	1,8	2,4	3	3,6	4,2	4,8
RT-Enzyme	1,2	2,4	3,6	4,8	6	7,2	8,4	9,6
DNA Polymerase	2,3	4,6	6,9	9,2	11,5	13,8	16,1	18,4

15,8 Volumen en µl

#### VORTEAR LA MASTER MIX II LIGERAMENTE ANTES DE DISPENSARLO



**PASAR A ZONA SUCIA (RNA)**

**¡¡MUY IMPORTANTE!!** Esta área sucia (RNA) no debe contener DNA, es decir no debe haberse trabajado con tubos de DNA amplificado por PCR. Si no se dispone de un área diferente además de la de amplificación y preparación de reactivos, es preferible añadir la muestra de RNA en el área limpia de preparación de reactivos. Posteriormente, limpiar esta área con lejía 10% y luz ultravioleta para evitar contaminaciones.

**Área 2 (para RNA) Preparación de reacción en la campana 2.      MANTENER LOS TUBOS EN HIELO**

- ☐ Encender el termociclador y dejar preparado el programa de RT-PCR listo para pulsar Start
- ☐ Añadir **10 µl** de cada muestra de RNA en el fondo de cada tubo correspondiente de RT-PCR. Con MASTER MIX 1. Mezclar suavemente con la pipeta (arriba y abajo) varias veces.
- ☐ Poner los tubos en el termociclador y comenzar el programa RT-PCR (**hcc-rt-pcr**) (26µl +14µl por tubo)

**90°C    2 min**

**50°C    5 + 55 min**

**94°C    2 min**

**94°C    30 sec**

**55°C    30 sec    x37**

**68°C    2 min**

**68°C    7 min**

**4°C    ∞**

- ☐ Cuando los tubos de RT-PCR alcancen los 50°C y lleven **5 min a 50°C** abrir el termociclador y sin sacar los tubos añadir **14 µl** de RT-PCR Master Mix II en el fondo de cada tubo y mezclar con la pipeta suavemente (arriba y abajo) varias veces (cambiar de punta).

**NO ABRIR TODOS LOS TUBOS A LA VEZ. HACERLO UNO POR UNO.**

- ☐ Cerrar la tapa del termociclador y permitir que el programa continúe hasta que haya terminado (alrededor de 4 horas)

Comprobar que aparecen bandas de 600 nt en un gel de agarosa.

3. **PCR semianidada:** Se realizó a partir del producto de la primera amplificación. Como cebadores, se empleó el mismo E14 que se había utilizado en la primera reacción de amplificación y el CC9, siguiendo el protocolo 3:

**Protocolo 3 –PCR semianidada de la región del Core. Modificado de Siemens Healthcare Diagnostics (150)**

### **HEMINESTED PCR**

Preparar MasterMix para N muestras + 1:

Nº. Reacciones	1	2	3	4	5	6	7	8
RT-PCR Buffer	6,5	13	19,5	26	32,5	39	45,5	52
CC9	1	2	3	4	5	6	7	8
E 14	1	2	3	4	5	6	7	8
dNTP	1	2	3	4	5	6	7	8
DNA pol	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	8,8	10
H2O Rnases free	12,3	24,5	36,8	49	61,3	73,5	85,8	98

Volumen final 23µl

- ☐ Alicuotar **23 µl** de MasterMix en el fondo de cada tubo de PCR (uno por muestra)
- ☐ Añadir **2 µl** del DNA amplificado (RT-PCR) de cada muestra. Mezclar suavemente con la pipeta (arriba y abajo) varias veces.
- ☐ Poner los tubos en el termociclador y comenzar el programa nested PCR (**hcc-nested**) (25µl por tubo)

**94°C 2 min**

**94°C 30 sec**

**55°C 30 sec x37**

**68°C 2 min**

**68°C 7 min**

**4°C ∞**

#### 2.1.2.3- Electroforesis en geles de agarosa

En la electroforesis en geles de agarosa se observaron bandas de amplificación tanto en la primera como en la segunda reacción de amplificación (Figura 16).

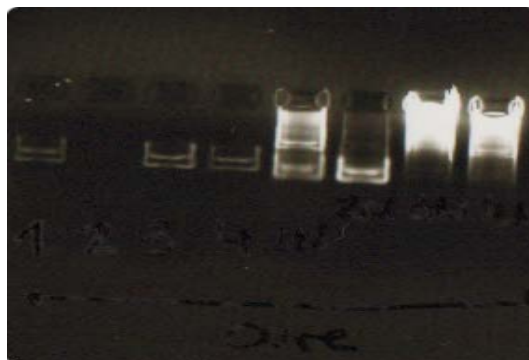


Figura 16 - Imagen de la electroforesis en gel de agarosa tras las dos reacciones de amplificación de la región del Core. Las primeras cuatro tras la RT-PCR, y las últimas tras la PCR semianidada

#### 2.1.2.4.- Secuenciación

Para la secuenciación se siguió el método descrito por Sanger en 1977 (151). Requiere cuatro reacciones de secuenciación, cada una con terminadores específicos (ddNTP) correspondientes a cada base (Adenina-Citosina-Guanina-Timina, A-C-G-T). Generándose así múltiples fragmentos de ADN de distintos tamaños que analizados, permiten recomponer la molécula de ADN a sintetizar

Se prepararon las cuatro reacciones de secuenciación empleando los cebadores marcados: CC9 5'-Cy5.5 y E14 3'-Cy5.0; siguiendo el protocolo 4:

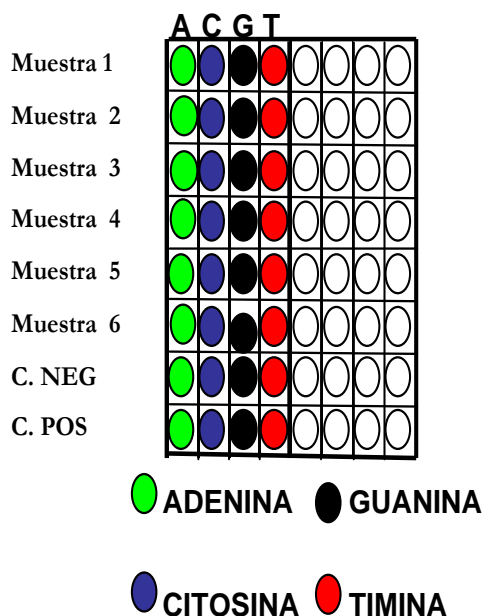
**PREPARACIÓN DE LA REACCIÓN SECUENCIACION CLIP™**

**DESCONGELAR LOS REACTIVOS** (terminadores, buffer CLIP, diluyente de la enzima y agua) A T° AMBIENTE EXCEPTO LA ENZIMA CLIP QUE VA DIRECTAMENTE AL HIELO  
**LOS TUBOS DE CLIP, TERMINADORES Y EL BUFFER UNA VEZ DESCONGELADOS DEBEN SER VORTEADOS Y PUESTO EN HIELO.**

**LA ENZIMA CLIP SE MEZCLA CON PIPETA ANTES DE SER DISPENSADA.**

**Área 1 (limpia) Preparación de reactivos de CLIP™ (campana 1).**

**TODAS LAS MEZCLAS DEBEN SER PREPARADAS EN HIELO**



- ☐ Rellenar una placa de 96 pocillos con tiras de tubos siguiendo el patrón mostrado arriba.
- ☐ Dispensar 3 µl de CLIP terminator (A-C-G-T de cada región) en el **FONDO** de cada tubo correspondiente (cuidado de no tocar las paredes para evitar posteriores contaminaciones).
- ☐ Diluir 1/10 la Enzima de secuenciación concentrada (Seq. Enz - 32 U/µl) en Dilution Buffer al volumen necesario para la Clip Master Mix (dependiendo del número de muestras analizadas)

muestras	1	2	3	4	5	6	7	8
Enz 32	0,4	0,8	1,2	1,6	2	2,4	2,8	3,2
Dil Buffer	4	8	12	16	20	24	28	32
TOTAL	4,4	8,8	13,2	17,6	22	26,4	30,8	35,2

- ☐ Preparar la CLIP™ Master Mix en un tubo de 1,5 ml

No. Reacciones	1	2	3	4	5	6	7	8
Agua	9,4	18,7	28,1	37,4	46,8	56,1	65,5	74,8
CLIP Buffer	2,8	5,5	8,3	11	13,8	16,5	19,3	22
Primer CC9 5'-Cy5.5 (5 µM)	1,1	2,2	3,3	4,4	5,5	6,6	7,7	8,8
Primer E14 3'-Cy5.0 (5 µM)	0,6	1,2	1,8	2,4	3	3,6	34,2	4,8
Seq Enz Dil. 1/10	4,4	8,8	13,2	17,6	22	26,4	30,8	35,2

18.2 volumen en µl

Concentración de los Primers HCV Core y NS5A = 5 µM (pmol/µl)

**VORTEAR LA MASTER MIX LIGERAMENTE ANTES DE SU USO!**

- ☐ Preparar tubos de 1,5 ml para alicuotar la CLIP™ Master Mix. y alicuotar **17 µl** de la CLIP™ Master Mix **en el fondo de cada tubo diferentes eppendorf de 1,5 mL (uno por cada muestra).**

#### PASAR A LA ZONA SUCIA (DNA)

**Area 3 (para DNA amplificado) trabajar en hielo en la campana 3 (solo para DNA amplificado)**

- ☐ Encender el termociclador y dejar preparado el programa de la CLIP listo para pulsar Star (hcvseqcore)

94°C	2 min	
94°C	30 sec	
59,1°C	30 sec, disminuir 0,5°C por ciclo	X14
70°C	1 min 30 sec	
94°C	30 sec	
52,1°C	30 sec	X19
70°C	1 min 30 sec	
70°C	5 min	
4°C	∞	

- ☐ Alicuotar **5 µl** del producto de RT-PCR de cada muestra en su tubo correspondiente de 1.5 ml que contiene la CLIP™ master mix. **MEZCLAR MUY BIEN CON LA PIPETA (10-15 veces).**
- ☐ Pasar **5 µl** de cada tubo de mezcla reactivo-CLIP™/amplificado-RT-PCR a la pared a cada uno de los 4 tubos correspondientes de cada una de las muestras, contienen cada uno de los terminadores (ACGT) **TODAS LAS MEZCLAS DEBEN SER PREPARADAS EN HIELO**
- ☐ Tapar bien cada tira de tubos con sus tapas y vortear la gradilla.  
Dar a la gradilla unos pequeños golpecitos encima de la poyata para que toda la mezcla de reacción se deposite en el fondo de los tubos.
- ☐ Poner los tubos en el termociclador previamente programado para la CLIP™ y pulsar start.
- ☐ Cuando el programa haya finalizado, descongelar a Tª ambiente el reactivo Stop Loading Dye, vortear y añadir 10 µl de esta solución Stop en la pared de cada tubo, taparlos bien y vortear. Dar a la gradilla unos pequeños golpecitos encima de la poyata para que toda la mezcla de reacción se deposite en el fondo de los tubos.
- ☐ Desnaturalizar las muestras a 94°C durante 3 minutos y pasar los tubos inmediatamente a hielo **sin permitir que la temperatura baje gradualmente.**
- ☐ Guardar las muestras a 4°C hasta que se monten los geles y se realice la electroforesis.

#### Electroforesis

Microcell	500
Surefil	6%
Temperature	60°C
Volt	2000
Time	70 min
Laser Power	50%
Sampling Time	0,5 sec
Volumen de muestra	3 µl

### 2.1.2.5.- Visualización de las secuencias e interpretación

El secuenciador automático OpenGene®System recoge los datos de los dos electroferogramas, “forward” y “reverse”, de cada muestra (Figura 17).

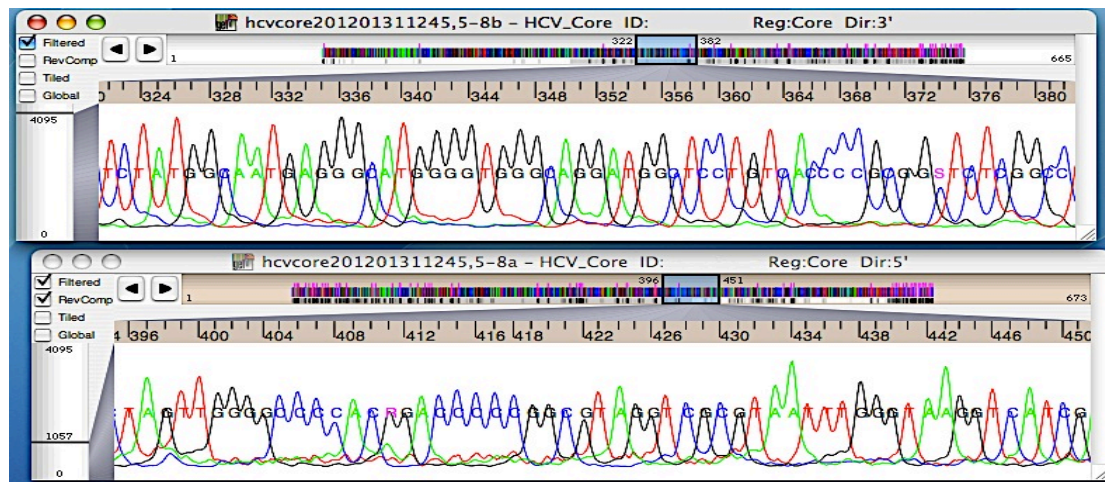


Figura 17 – Imagen del electroferograma “forward” y “reverse” de una secuencia del Core a estudio

El mismo equipo los orienta y alinea, y compara los resultados obtenidos con la secuencia de referencia con la que ha sido programado. De encontrar mutaciones las marca, permitiendo ver cuál es el nucleótido presente tanto en la secuencia a estudio como en la secuencia de referencia (Figura 18).



Figura 18 – Imagen del análisis de la secuencia problema y su comparación con la secuencia de referencia de la región del Core. En la región superior aparecen los dos electroferogramas de la secuencia problema. En la región inferior aparecen la secuencia de aminoácidos y nucleótidos de la secuencia problema y de la secuencia de referencia. Los nucleótidos marcados en verde se corresponden con las mutaciones encontradas.

### 2.1.2.6.- Informes

Finalmente, emite un informe en el que recoge todos los cambios tanto de nucleótidos como de aminoácidos que ha encontrado (Figura 19).

```

GENOTYPIC IDENTIFICATION OF MUTATIONS

Sample ID: xxxxxx
Case ID: xxxxxxxx
Date Drawn:
Export Date:
Software: GeneObjects(TM) 4.1 (2008/05/26)
Library: HCV_Core.gnl

Effects related mutations:

Core
208 (CGC) R70Q (CAg)
223 (ACC) T75A (gCC)
271 (CTC) L91M (ATG)

Silent Mutations (at all positions):

Core
145 (ACA) T49T (ACT)
157 (TCG) S53S (TCC)
166 (TCC) S56S (tCG)
169 (CAG) Q57Q (CAA)
172 (CCA) P58P (CCT)
184 (CGC) R62R (CGA)
187 (CAG) Q63Q (CAA)
190 (CCC) P64P (CCT)
196 (CCT) P66P (CCC)
199 (AAA) K67K (AAG)
202 (GCC) A68A (GCT)
205 (CGG) R69R (CgC)
220 (CGA) R74R (aGg)
232 (CAA) Q78Q (CAG)
235 (CCA) P79P (CCC)
238 (GGA) G80G (GGG)
253 (CTA) L85L (CTC)
256 (TAC) Y86Y (TAT)
259 (GGG) G87G (GGC)
262 (AAT) N88N (AAC)
268 (GGA) G90G (GGC)
274 (GGC) G92G (GGG)
295 (TCC) S99S (TCA)
301 (CGA) R101R (CGT) ***
304 (GGT) G102G (GGc)
310 (CGT) R104R (CGG)
313 (CCC) P105P (CcT)
316 (TCT) S106S (AGT) ***
328 (ACT) T110T (ACA) ***
349 (CGC) R117R (cGT)

Amino acid changes not at effects related sites:

Core
340 (CAT) H114R (CGT)
355 (GTG) V119L (TTG)

```

Figura 19 – Informe de mutaciones de la región del Core emitido por el secuenciador.



## 2.2.- Estudio de la región NS5A

### 2.2.1.- SECUENCIA DE REFERENCIA

Se buscó una secuencia salvaje de la región NS5A del VCH genotipo 1b en la base de datos del GenBank del NCBI, empleada como secuencia de referencia, del mismo modo que se hizo en la región del Core.

En ella se localizaron las regiones donde aplican los cebadores descritos por Akuta, y cols. (149):

- ISDR1: 5'-ATG CCC ATG CCA GGT TCC AG-3'
- ISDR2: 5'-AGC TCC GCC AAG GCA GAA GA-3' (antisentido)
- ISDR3: 5'-ACC GGA TGT GGC AGT GCT CA-3'
- ISDR4: 5'-GTA ATC CGG GCG TGC CCA TA-3' (antisentido)

Se programó el secuenciador OpenGene®System de Siemens con la secuencia resultante comprendida entre los nucleótidos 6598-6778 que corresponde a los aminoácidos 2200-2260 (Figura 20), con la que se compararán las secuencias de cada paciente.

```
AGCTCTTCAGCTAGCCAGTTGTCTGCGCCTTCCCTGAAGGCGACATGCACTACCCATC
ATGACTCCCCAGACGCTGACCTCATCGAGGCCAATCTCCTGTGGCGGCAGGAGATGG
GCGGGAACATCACCCGCGTGGAGTCAGAGAATAAGGTGGTAGTTTTGGACTCTTTCG
AGCCGCTTCGA
```

Figura 20 - Secuencia de referencia de la región NS5A (6598-6778 nt.)

### 2.2.2.- CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE LA REGIÓN NS5A

Del mismo modo, se diseñó un protocolo para la determinación de la variabilidad genética de esta región basados en los trabajos de Akuta, y cols. y Enomoto, y cols. y la Guía TRUGENE de Siemens Healthcare Diagnostics (149, 150, 152) que comprenden la secuenciación directa de la región tras la extracción del ARN viral y su amplificación por RT-PCR.

El laboratorio TIB®MOLBIOL Syntheselabor GmbH sintetizó los cebadores; mientras que el laboratorio Siemens Healthcare Diagnostics suministró las enzimas,

desoxinucleótidos, terminadores, soluciones tampón, agua libre de RNAasa, inhibidor de RNAasa y ditiotritol.

### 2.2.2.1- Extracción del ARN viral:

Igual que para la secuenciación de la región del Core, se empleó el ARN viral que se había extraído para la determinación de la carga viral mediante el método comercial COBAS®AmpliPrep (Roche).

### 2.2.2.2.- Amplificación:

La amplificación se realizó mediante RT-PCR seguida de una PCR anidada.

1. **Preparación de reactivos:** Los cebadores tuvieron que ser preparados previamente siguiendo las recomendaciones del fabricante (Protocolo 5):

#### Protocolo 5 - Preparación de los cebadores de las dos reacciones de amplificación de la región NS5A

##### Preparación de Primers para RT-PCR y nested PCR:

Añadir el volumen indicado de agua libre de Dnasas a cada primer según Synthesis Report para obtener una concentración de 100  $\mu$ M (100 pmoles/ $\mu$ l)

Hacer alicuotas de primer a 20  $\mu$ M (20 pmoles/ $\mu$ l). Dilución 1/50.

Ej: 10 $\mu$ l de primer +490  $\mu$ l de agua libre de DNAsas. Alicuotar en 10 tubos de 50  $\mu$ l cada uno.

(ISDR1: 251  $\mu$ l, ISDR2: 235 $\mu$ l, ISDR: 248 $\mu$ l e ISDR4: 235 $\mu$ l)

2. **RT-PCR:** La primera reacción de amplificación se realizó mediante RT-PCR, que permitió la retrotranscripción del ARN viral, y así, obtener el ADNc que será amplificado en la región comprendida entre los cebadores ISDR1 e ISDR2 mediante PCR. Según el protocolo 6:

**Protocolo 6 - RT-PCR de la región NS5A. Modificado de Siemens Healthcare Diagnostics (150)**

## RT-PCR

### Área 1 (limpia) Preparación de reactivos (campana 1)

#### TODAS LAS MEZCLAS DEBEN SER PREPARADAS EN HIELO

- ☐ Descongelar a Tª ambiente los reactivos (H<sub>2</sub>O, Primers, dNTP, DTT y RT-PCR Bufer) luego vortear (pulso de centrifuga si fuera necesario) y pasarlos a hielo.
- ☐ Las **enzimas RT ENZ, DNA Pol y RNasa IN pasan a hielo directamente y no se vortean, se mezclan con pipeta antes de ser dispensadas.**
- ☐ Preparar la RT-PCR MASTER MIX I en un tubo de 1,5 ml.

Nº. Reacciones	1	2	3	4	5	6	7	8
H <sub>2</sub> O Rnases free	12,8	25,6	38,4	51,2	64	76,8	90	102
ISDR1	1,2	2,4	3,6	4,8	6	7,2	8,4	9,6
ISDR2	1,2	2,4	3,6	4,8	6	7,2	8,4	9,6
dNTP	1,75	3,5	5,3	7	8,8	10,5	12	14
DTT	1,2	2,4	3,6	4,8	6	7,2	8,4	9,6
Rnase-In	0,6	1,2	1,8	2,4	3	3,6	4,2	4,8

18,75 Volumen en µl

#### VORTEAR LA MASTER MIX I LIGERAMENTE ANTES DE DISPENSARLO

- ☐ Alicuotar **16 µl** de la RT-PCR Master Mix I en el fondo de cada tubo de PCR de 0,2 ml (uno por muestra)

#### MANTENER LOS TUBOS EN HIELO

- ☐ Preparar la RT-PCR MASTER MIX II en un tubo de 1,5 ml.  
Mezclar con la pipeta la RT ENN, DNA POL y RNase IN antes de dispensarlo.

Nº. Reacciones	1	2	3	4	5	6	7	8
RT-PCR Buffer 1	11,7	23,4	35,1	46,8	58,5	70,2	81,9	93,6
Rnase-In	0,6	1,2	1,8	2,4	3	3,6	4,2	4,8
RT-Enzyme	1,2	2,4	3,6	4,8	6	7,2	8,4	9,6
DNA Polymerase	2,3	4,6	6,9	9,2	11,5	13,8	16,1	18,4

15,8 Volumen en µl

#### VORTEAR LA MASTER MIX II LIGERAMENTE ANTES DE DISPENSARLO

**PASAR A ZONA SUCIA (RNA)**

**¡¡MUY IMPORTANTE!!** Esta área sucia (RNA) no debe contener DNA, es decir no debe haberse trabajado con tubos de DNA amplificado por PCR. Si no se dispone de un área diferente además de la de amplificación y preparación de reactivos, es preferible añadir la muestra de RNA en el área limpia de preparación de reactivos. Posteriormente, limpiar esta área con lejía 10% y luz ultravioleta para evitar contaminaciones.

**Área 2 (para RNA) Preparación de reacción en la campana 2.      MANTENER LOS TUBOS EN HIELO**

Encender el termociclador y dejar preparado el programa de RT-PCR listo para pulsar Start

- ☐ Añadir **10 µl** de cada muestra de RNA en el fondo de cada tubo correspondiente de RT-PCR. Con MASTER MIX 1. Mezclar suavemente con la pipeta (arriba y abajo) varias veces.
- ☐ Poner los tubos en el termociclador, comenzar el programa de RT-PCR (**hcc-rt-pcr**) (26µl +14µl por tubo)

<b>90°C</b>	<b>2 min</b>	
<b>50°C</b>	<b>5 + 55 min</b>	
<b>94°C</b>	<b>2 min</b>	
<b>94°C</b>	<b>30 sec</b>	
<b>55°C</b>	<b>30 sec</b>	<b>x37</b>
<b>68°C</b>	<b>2 min</b>	
<b>68°C</b>	<b>7 min</b>	
<b>4°C</b>	<b>∞</b>	

- ☐ Cuando los tubos de RT-PCR alcancen los 50°C y lleven **5 min a 50°C** abrir el termociclador y sin sacar los tubos añadir **14 µl** de RT-PCR Master Mix II en el fondo de cada tubo y mezclar con la pipeta suavemente (arriba y abajo) varias veces (cambiar de punta).

**NO ABRIR TODOS LOS TUBOS A LA VEZ. HACERLO UNO POR UNO.**

- ☐ Cerrar la tapa del termociclador y permitir que el programa continúe hasta que haya terminado (alrededor de 4 horas)

Comprobar que aparecen bandas de 600 nt en un gel de agarosa.

3. **PCR anidada:** A partir del producto de esta primera amplificación, se realizó una segunda amplificación anidada empleando los cebadores, ISDR3 e ISDR4, según protocolo 7:

**Protocolo 7 – PCR anidada de la región NS5A. Modificado de Siemens Healthcare Diagnostics (150)**

### **NESTED PCR**

Preparar MasterMix para N muestras + 1:

Nº. Reacciones	1	2	3	4	5	6	7	8
RT-PCR Buffer	6,5	13	19,5	26	32,5	39	45,5	52
ISDR3	1	2	3	4	5	6	7	8
ISDR4	1	2	3	4	5	6	7	8
dNTP	1	2	3	4	5	6	7	8
DNA pol	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	8,8	10
H2O Rnases free	12,3	24,5	36,8	49	61,3	73,5	85,8	98

Volumen final 23µl

- ☐ Alicuotar **23 µL** de MasterMix en el fondo de cada tubo de PCR (uno por muestra)
- ☐ Añadir **2 µL** del DNA amplificado (RT-PCR) de cada muestra. Mezclar suavemente con la pipeta (arriba y abajo) varias veces.
- ☐ Poner los tubos en el termociclador y comenzar el programa de nested PCR (hcc-nested) (25µl por tubo)

<b>94°C</b>	<b>2 min</b>	
<b>94°C</b>	<b>30 sec</b>	
<b>55°C</b>	<b>30 sec</b>	<b>x37</b>
<b>68°C</b>	<b>2 min</b>	
<b>68°C</b>	<b>7 min</b>	
<b>4°C</b>	<b>∞</b>	

#### **2.2.2.3.- Electroforesis en geles de agarosa**

Se visualizaron los amplificados de ambas reacciones mediante electroforesis en geles de agarosa, con resultados parecidos a los obtenidos en la región del Core.

### 2.2.2.4.- Secuenciación

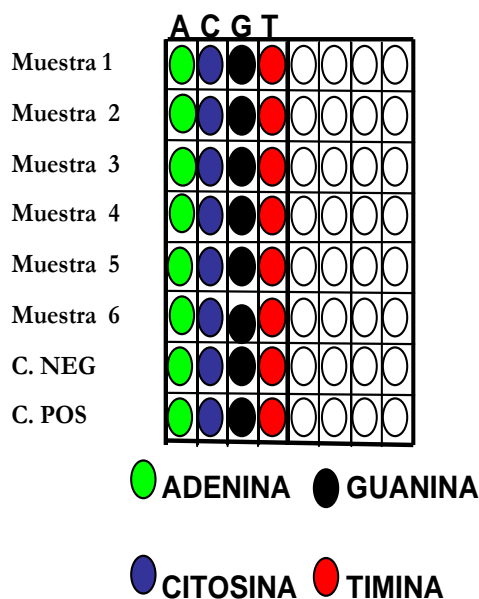
La secuenciación se realizó mediante el método de Sanger (151) con los cebadores marcados ISDR3 5'-Cy5.5 e ISDR4 3'-Cy5.0 siguiendo el protocolo 8:

Protocolo 8 - Secuenciación de la región NS5A. Modificado de Siemens Healthcare Diagnostics (150)

#### PREPARACIÓN DE LA SECUENCIACION CLIP™

**DESCONGELAR LOS REACTIVOS** (terminadores, buffer CLIP, diluyente de la enzima y agua) A T° AMBIENTE EXCEPTO LA ENZIMA CLIP QUE VA DIRECTAMENTE AL HIELO  
LOS TUBOS DE CLIP, TERMINADORES Y EL BUFFER UNA VEZ DESCONGELADOS DEBEN SER VORTEADOS Y PUESTO EN HIELO.  
LA ENZIMA CLIP SE MEZCLA CON PIPETA ANTES DE SER DISPENSADA.

**Área 1 (limpia)** Preparación de reactivos de CLIP™ (campana 1).  
**TODAS LAS MEZCLAS DEBEN SER PREPARADAS EN HIELO**



- ☐ Rellenar una placa de 96 pocillos con tiras de tubos siguiendo el patrón mostrado arriba.
- ☐ Dispensar 3 µl de CLIP terminator (A-C-G-T de cada región) en el **FONDO** de cada tubo correspondiente (cuidado de no tocar las paredes para evitar posteriores contaminaciones).
- ☐ Diluir 1/10 la Enzima de secuenciación concentrada (Seq. Enz - 32 U/µl) en Dilution Buffer al volumen necesario para la Clip Master Mix (dependiendo del número de muestras analizadas)

muestras	1	2	3	4	5	6	7	8
Enz 32	0,4	0,8	1,2	1,6	2	2,4	2,8	3,2
Dil Buffer	4	8	12	16	20	24	28	32
TOTAL	4,4	8,8	13,2	17,6	22	26,4	30,8	35,2

- ☐ Preparar la CLIP™ Master Mix en un tubo de 1,5 ml

No. Reacciones	1	2	3	4	5	6	7	8
Agua	9,4	18,7	28,1	37,4	46,8	56,1	65,5	74,8
CLIP Buffer	2,8	5,5	8,3	11	13,8	16,5	19,3	22
Primer ISDR3 5'-Cy5.5 (5 µM)	1,1	2,2	3,3	4,4	5,5	6,6	7,7	8,8
Primer ISDR4 3'-Cy5.0 (5 µM)	0,6	1,2	1,8	2,4	3	3,6	4,2	4,8
Seq Enz Dil. 1/10	4,4	8,8	13,2	17,6	22	26,4	30,8	35,2

18.2 volumen en ul

Concentración de los Primers HCV Core y NS5A = 5 µM (pmol/µl)

### VORTEAR LA MASTER MIX LIGERAMENTE ANTES DE SU USO

- ☐ Preparar tubos de 1,5 ml para alicuotar la CLIP™ Master Mix. y alicuotar **17 µl** de la CLIP™ Master Mix **en el fondo de cada tubo diferentes eppendorf de 1,5 mL (uno por cada muestra).**

### PASAR A LA ZONA SUCIA (DNA)

**Area 3 (para DNA amplificado)** trabajar en hielo en la campana 3 (solo para DNA amplificado)

- ☐ Encender el termociclador y dejar preparado el programa de CLIP listo para pulsar Star (hcvseqns5a)

94°C	5 min	
94°C	20 sec	
55°C	20 sec	X30
70°C	1 min 30 sec	
70°C	5 min	
4°C	∞	

- ☐ Alicuotar **5 µl** del producto de RT-PCR de cada muestra en su tubo correspondiente de 1.5 ml que contiene la CLIP™ master mix. **MEZCLAR MUY BIEN CON LA PIPETA (10-15 veces).**
- ☐ Pasar **5 µl** de cada tubo de mezcla reactivo-CLIP™/amplificado-RT-PCR a la pared a cada uno de los 4 tubos correspondientes de cada una de las muestras contienen cada uno de los terminadores (ACGT) **TODAS LAS MEZCLAS DEBEN SER PREPARADAS EN HIELO**
- ☐ Tapar bien cada tira de tubos con sus tapas y vortear la gradilla.  
Dar a la gradilla unos pequeños golpecitos encima de la poyata para que toda la mezcla de reacción se deposite en el fondo de los tubos.
- ☐ Poner los tubos en el termociclador previamente programado para la CLIP™ y pulsar start.
- ☐ Cuando el programa haya finalizado, descongelar a Tª ambiente el reactivo Stop Loading Dye, vortear y añadir 10 µl de esta solución Stop en la pared de cada tubo, taparlos bien y vortear. Dar a la gradilla unos pequeños golpecitos encima de la poyata para que toda la mezcla de reacción se deposite en el fondo de los tubos.
- ☐ Desnaturalizar las muestras a 94°C durante 3 minutos y pasar los tubos inmediatamente a hielo **sin permitir que la temperatura baje gradualmente.**
- ☐ Guardar las muestras a 4°C hasta que se monten los geles y se realice la electroforesis.

### Electroforesis

Microcell	500
Surefil	6%
Temperature	60°C
Volt	2000
Time	50 min
Laser Power	50%
Sampling Time	0,5 sec
Volumen de muestra	3 µl



### 2.2.2.5.- Visualización de las secuencias e interpretación

Se empleó el mismo secuenciador (OpenGene®System) que recogió los datos de los dos electroferogramas, “forward” y “reverse”, de cada muestra (Figura 21).

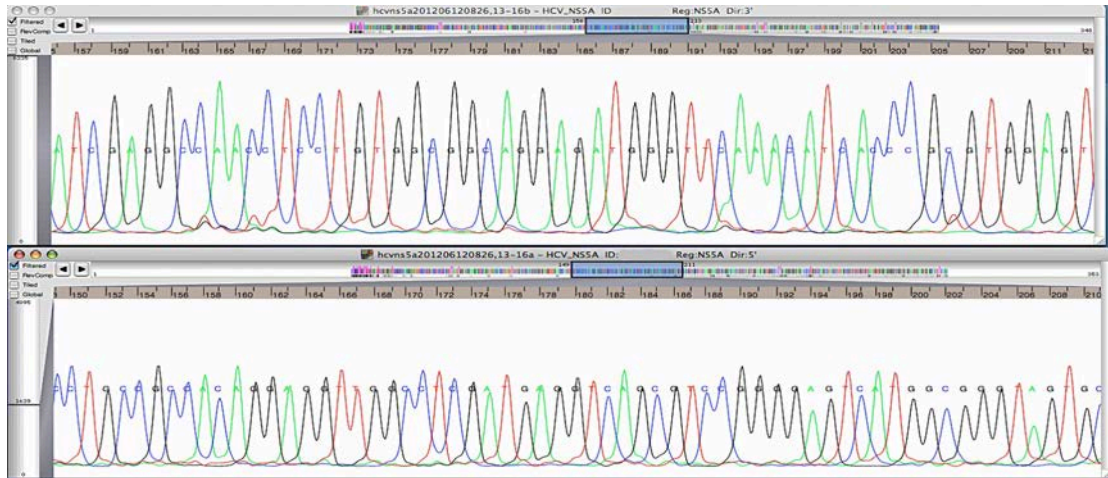


Figura 21 - Imagen del electroferograma "forward" y "reverse" de una secuencia a estudio de la región NS5A

El equipo orienta y alinea las secuencias “forward” y “reverse” de cada muestra y compara los resultados obtenidos con la secuencia de referencia de esta región con la que ha sido programado señalando las diferencias en nucleótidos y aminoácidos, al igual que hacía en la región del Core (Figura 22).



Figura 22 - Imagen del análisis de la secuencia problema y su comparación con la secuencia de referencia de la región NS5A. En la región superior aparecen los dos electroferogramas de la secuencia problema. En la región inferior aparecen la secuencia de aminoácidos y nucleótidos de la secuencia problema y de la secuencia de referencia. Los nucleótidos marcados en verde se corresponden con las mutaciones encontradas

### 2.2.2.6.- Informes

Del mismo modo, recoge todos los cambios en los nucleótidos y en los aminoácidos que encuentra en un informe final (Figura 23).

```

GENOTYPIC IDENTIFICATION OF MUTATIONS

Sample ID: xxxxxx
Case ID: xxxxxxxx
Date Drawn:
Export Date:
Software: GeneObjects(TM) 4.1 (2008/05/26)
Library: HCV_NS5A.gnl

Effects related mutations:

NS5A
6652 (CAT) H2218R (CGT)

Silent Mutations (at all positions):

NS5A
6601 (TCT) S2201S (TCc)
6610 (AGC) S2204S (AGT)
6616 (TTG) L2206L (cTG)
6625 (CCT) P2209P (CCA) ***
6640 (ACA) T2214T (ACG) ***
6646 (ACT) T2216T (ACC) ***
6664 (CCA) P2222P (CCG) ***
6670 (GCT) A2224A (GCC) ***
6688 (AAT) N2230N (AAC)
6715 (GGG) G2239G (GGA)
6727 (CGC) R2243R (CGt)
6730 (GTG) V2244V (GTa)
6736 (TCA) S2246S (TCg)
6742 (AAT) N2248N (AAC) ***
6745 (AAG) K2249K (AAA)
6757 (TTG) L2253L (CTG)

Amino acid changes not at effects related sites:

NS5A
6754 (GTT) V2252I (ATC)
6769 (GAG) E2257D (GAC)

```

Figura 23 – Informe de mutaciones de la región NS5A emitido por el secuenciador.

### **2.3.- Optimización de los protocolos de secuenciación de ambas regiones**

Con el objetivo de simplificar la técnica se pensó que se podría prescindir de la segunda reacción de amplificación para la secuenciación en ambas regiones, ya que en los primeros casos estudiados, se secuenciaron los amplificadores obtenidos tras la primera y tras la segunda amplificación. Y se pudo comprobar que los resultados fueron iguales en la primera amplificación que en la segunda reacción. Por ello, se prescindió de la segunda reacción de amplificación en ambas regiones en todos los demás casos, y sólo se pensó realizar esta PCR anidada en aquellos casos en los que hubiera alguna dificultad en la secuenciación, pero no fue preciso realizarla en ningún caso.

## **3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

### **3.1.- Análisis descriptivo**

Las variables cualitativas se presentan con su distribución de frecuencias. Las variables cuantitativas se resumen con su media y desviación estándar (DE). Las variables que no siguen una distribución normal se expresan con mediana y rango intercuartílico (RIQ). En todos los casos se comprobó la distribución de las variables frente a los modelos teóricos.

### **3.2.- Análisis univariado**

Se evaluó la asociación entre variables cualitativas con el test de Ji-cuadrado o prueba exacta de Fisher, en el caso de que más de un 25% de los esperados fueran menores de 5. Las comparaciones de medias se realizaron mediante el test de la t de Student, previa realización del test de homogeneidad de varianzas de Levene, si las variables siguieran una distribución normal en los grupos a comparar. Para la comparación de las variables continuas, que no se ajustan a la distribución normal, se utilizó el test no paramétrico de U de Mann-Whitney.

Se estimó el efecto de la presencia de mutaciones con el fracaso en el tratamiento mediante el cálculo del Odds Ratio (OR) junto a su intervalo de confianza (IC) al 95%.

### **3.3.- Estudio conjunto de ambas regiones: sustituciones en el aminoácido 70 de la región del Core (Core70) y mutaciones en la región ISDR**

Inicialmente se evaluó el efecto independiente de las mutaciones en cada una de las regiones sobre el fracaso en el tratamiento mediante un modelo de regresión logística binario introduciendo ambas mutaciones como variables independientes. Se estimó la capacidad de predicción de fracaso en el modelo de cada una de las mutaciones de manera individual como la combinación de ambas a través del cálculo del área bajo la curva (ABC).

En todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula con un error de tipo I o error  $\alpha$  menor a 0,05. El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico SPSS 15.0.

## IV. Resultados

## 1.- CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE AMBAS REGIONES Y PREVALENCIA DE MUTACIONES

### 1.1- Descripción del conjunto completo de la muestra

Setenta pacientes con infección crónica por VHC genotipo 1b y carga viral detectable se incluyeron para el estudio de ambas regiones. 31 varones y 39 mujeres (Gráfico 1).

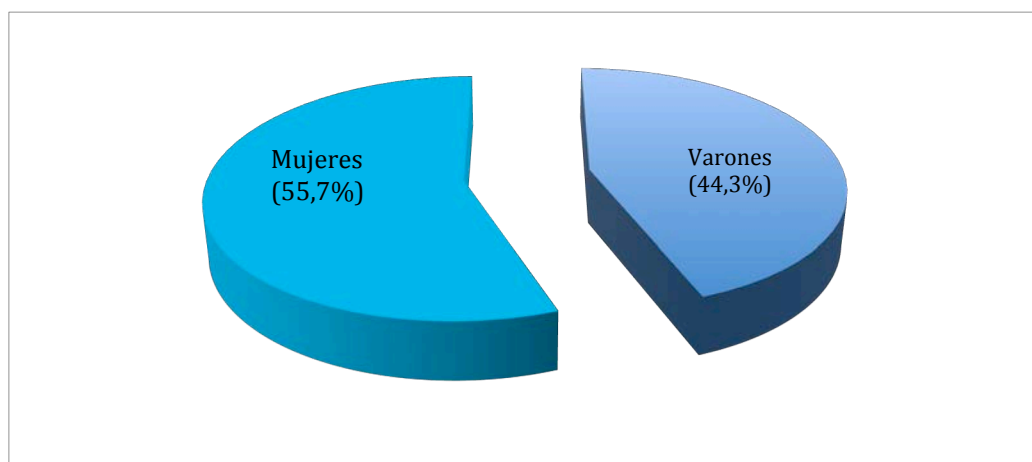


Gráfico 1 - Distribución según sexo

Las edades estaban comprendidas entre 29 y 76 años, con una edad media de 55,09 años (DE:10,12), (Gráfico 2). La mayor parte de los pacientes tenían entre 50 y 69 años.

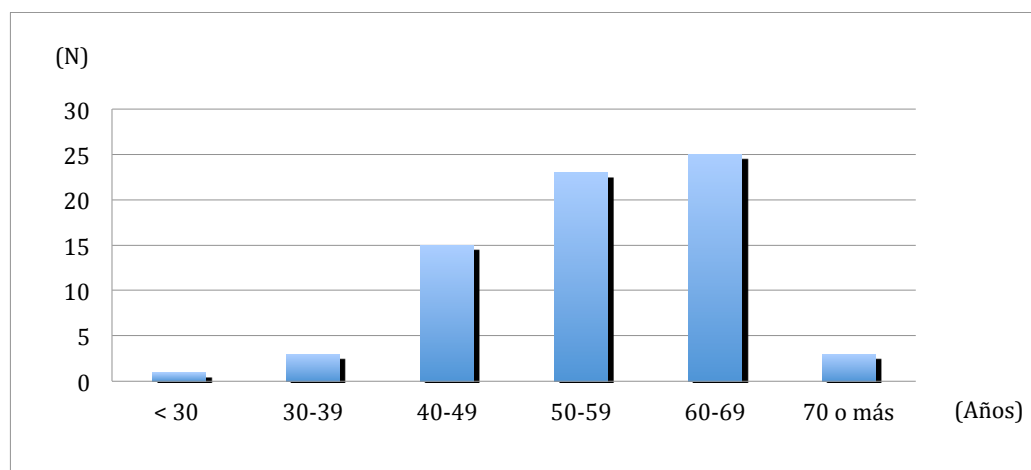


Gráfico 2 - Distribución según edad

El 88,6% (62 casos) eran pacientes españoles; 7 casos (10%) procedían del resto de Europa, el caso restante era de Ecuador (Gráfico 3)

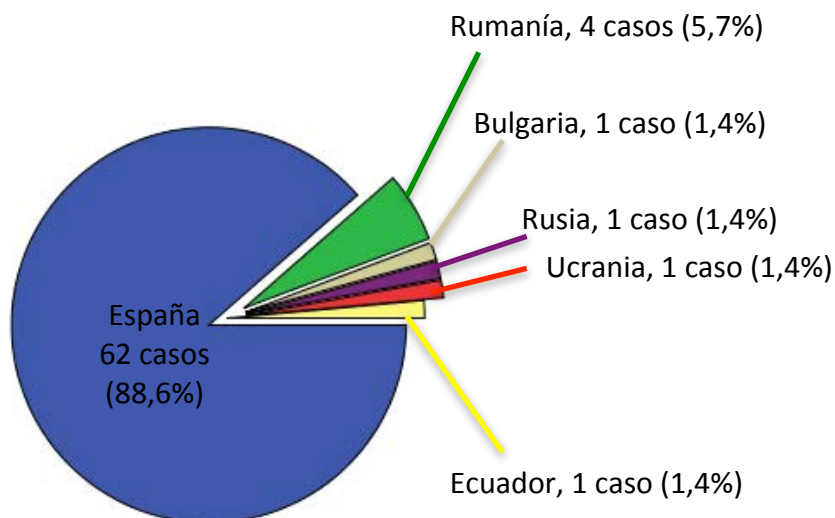


Gráfico 3 - Distribución según el país de procedencia

Sólo en un caso se detectó coinfección con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH): Una mujer de 40 años de nacionalidad ucraniana que no siguió tratamiento (caso 66).

La carga viral mínima fue de 5.027 UI/ml., y la máxima de 43.689.191 UI/ml., con una mediana de 2.976.552 UI/ml. (RIQ:986.809,25–5.929.894,5). El 84,3% de los pacientes presentaba una carga >400.000 UI/ml.

## 1.2.- Variabilidad genómica de la región del Core

Todas las secuencias obtenidas se pueden ver en la figura 24.

Analizando las secuencias completas entre los aminoácidos 45-125, se encontraron mutaciones en todos los casos, con una mediana de 6 mutaciones (RIQ:5-10). Se observaron dos casos (55 y 67) con una gran variabilidad genómica, con 28 y 26 mutaciones, respectivamente.

Sec	45	50	60	70	80	90	100	110	120	125
consenso	GVRATR	KTTERSQPRG	RRQPIPKARR	PEGRTWAQPG	YPWPLYGNEG	LGWAGWLLSP	RGSRPSWGPT	DPRHRSRNVG	KVIDT	
Casos										
1.						M				
2.				Q	A	M				
3.			E			A	N			
4.			Q			M				
5.			G	S	R	A		N		
6.					A		M	T		
7.										
8.				L	Q	A	A			
9.					G	A				
10.						M				
11.		Q			RS	Y		AP	C	
12.	G	R	AS	R	G	A	VR	H		
13.		E	A	T	H	GA				
14.				HL	RLAD	Q	V	IL		
15.				VVQ		AGL		M	A	
16.				Q		A			D	
17.				Q		A				
18.				TVAS	H	I		M	Q	
19.					GA			M		
20.					G		D	M		
21.				Q		A				
22.				Q		A	H	M		
23.				Q	H	A			S	
24.					A			M		
25.								M		
26.				Q		PG		M		
27.			A	Q		D	HA	M		
28.										
29.				S		M		M		
30.				Q				M		
31.								M		
32.				T	Q	GA			E	
33.	A			T				M		
34.		W		N	Q	W	P			
35.	CLS	A	GA	RQ		F		V	T	
36.						A		L		
37.	V			H		S	N	M		
38.				Q		A		M		
39.				H					C	AY
40.					RA			M		
41.					GL			M		
42.				RR	Q	A	H	M		
43.				T					N	
44.				Q		AL		M		
45.					LA		L	WRD		
46.					A		C	T		
47.				Q		A	CSA		VL	
48.				Q		V		A		
49.			E	SRE		KGL	AR		A	
50.						SA				
51.								C		
52.	P	P	R		F	PG		LN		
53.						A		V		
54.				G	K	Q		A		
55.		RA	Y		Y	C		G		
56.					Q			S	H	
57.				HA		RGF	A		G	D
58.						A				
59.				Q		H				
60.				Q						
61.				Q			C			
62.	P				V	H			C	
63.				K	Q				I	
64.					A			D		
65.				Q		A	A		LA	
66.										
67.	V	A	A		L	V	C			
68.						GA				
69.										
70.			R	NG	SPKRF	Q		A	H	

Figura 24 - Secuencias de la región del Core (45-125 aminoácidos) de los 70 pacientes. En AMARILLO: Secuencia entre 61 y 110 aminoácidos. En VERDE: Casos con RESPUESTA. En ROJO: Casos con FRACASO.



En cuanto a las secuencias de los extremos, la región comprendida entre los aminoácidos 45-60 estaba bastante conservada, con 56 casos sin ninguna mutación (80%). Por el contrario, entre los aminoácidos 111-125 había una mayor variabilidad: con mutaciones en todos los casos, y en el 65,7% con 2.

Entre los aminoácidos 61-110, región estudiada con más frecuencia por otros autores, sólo en dos casos no se observaron mutaciones (casos 7 y 28); mientras que los casos 67 y 55 con 20 y 18 mutaciones, respectivamente, son los que presentaron una mayor tasa de mutación. La mediana fue de 4 mutaciones (RIQ:2,75-6). El 70% tenían entre 1 a 5 mutaciones (Gráfico 4).

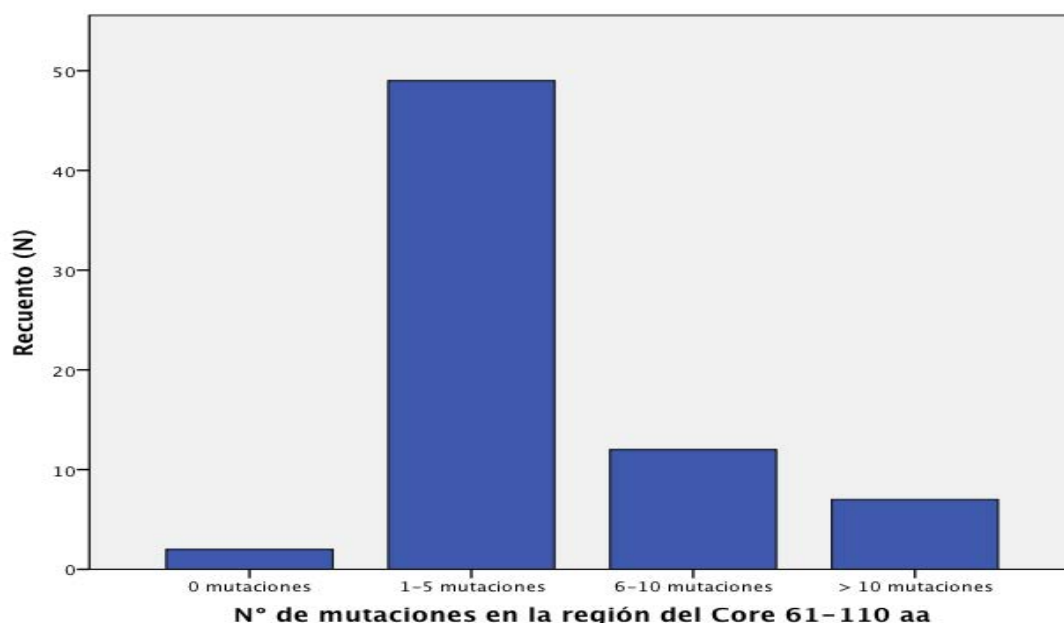


Gráfico 4 – Distribución según el número de mutaciones en la región del Core entre los aminoácidos 61 y 110

En su mayoría fueron mutaciones puntuales con una baja frecuencia (Gráfico 5), tanto en la región central como en las regiones de los extremos.

Entre los aminoácidos 45-60 se detectaron menos mutaciones, sin ninguna en los codones 48, 57-59. Por el contrario, en el otro extremo (111-125 aa.), se observaron a lo largo de toda la secuencia y con una mayor prevalencia, casi todos los casos estaban mutados en los aminoácidos 119 y 114 (97,1% y 95,7%,

respectivamente), siendo éstas las dos únicas mutaciones encontradas en los casos 7 y 28.

En la región central, la mayor tasa de mutaciones se observó en los codones 70, 75, 78, 91, 106 y 110. Mientras que en el codón 97 no se encontró ninguna mutación.

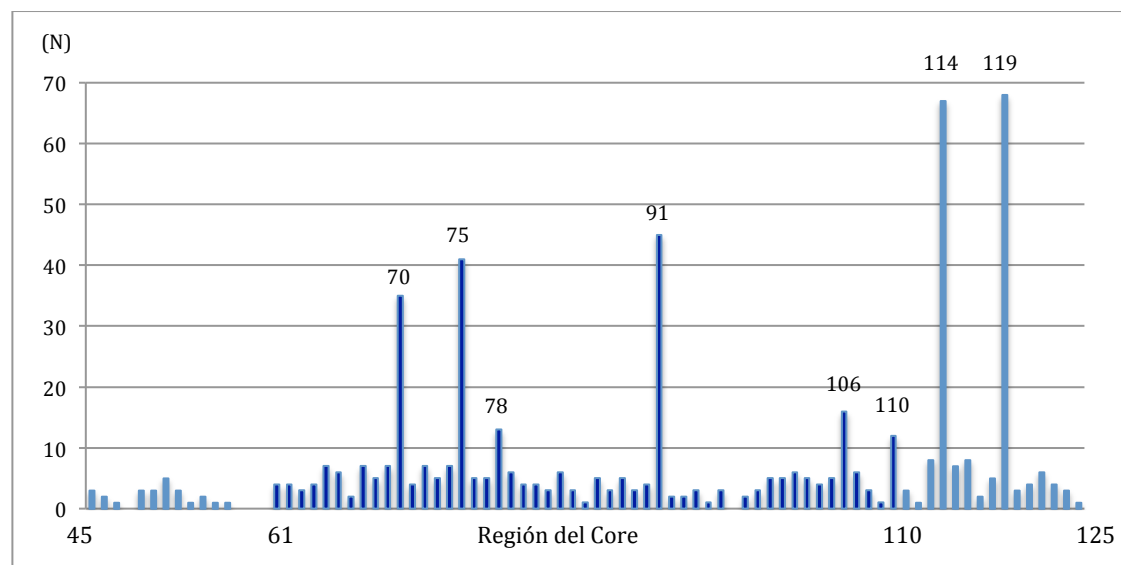


Gráfico 5 – Frecuencia de mutaciones en la región del Core

Las frecuencias observadas son debidas a las diversas mutaciones que se han encontrado en cada codón, con gran variabilidad en algunos de ellos, sobre todo, en 75, 106 y 110 (Gráfico 6).

La mutación más frecuente en el aminoácido 119 es debida a la sustitución de valina por leucina (**V119L**), que aparece en el 91,4% de los casos, siendo ésta la mutación más prevalente de toda la serie. Algo parecido ocurre en 114, donde la histidina es sustituida por arginina (**H114R**) en 60 de los 67 casos mutados (85,7%).

En el aminoácido 91, 45 casos (64,3%) estaban mutados, con la expresión de metionina (**L91M**) en 39 de ellos (55,7% del total). En el 58,6% (41 casos) aparecían mutaciones en el aminoácido 75, debidas a la sustitución de alanina por treonina (**T75A**) en 30 de ellos (42,9% del total). En el codón 70, se observaron mutaciones en la mitad de los casos, y, aunque aparecen 6 aminoácidos diferentes, con glutamina (**R70Q**) en 28 de ellos, el 40% del total.

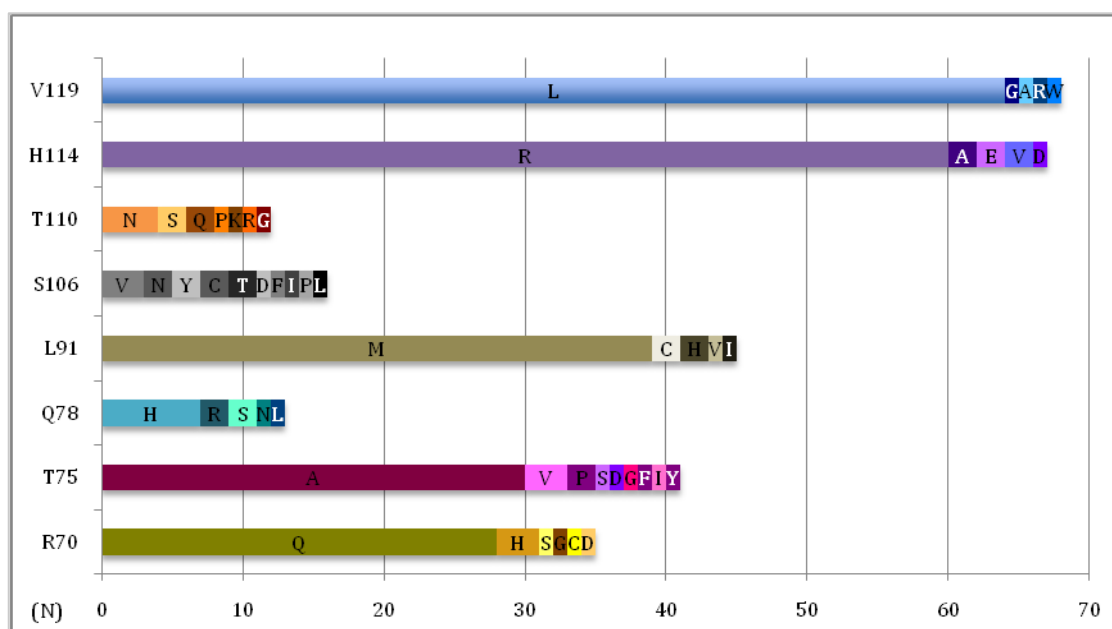


Gráfico 6 – Mutaciones más prevalentes en la región del Core

Resultados preliminares de este estudio fueron presentados en el “53<sup>rd</sup>. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy” (ICAAC), (153)

En muchos de los casos que no presentaban mutaciones, se observaron sustituciones en los nucleótidos, polimorfismos que no dieron lugar a cambios de aminoácidos.

En algunas posiciones estaban presentes con una gran prevalencia: 49, 53, 56-58, 62-64, 66-69, 74, 77-80, 82, 85-87, 90, 92, 99, 101-106, 110 y 117-118. Sin embargo, no se detectó ninguno en 46, 54, 72, 76, 83, 93, 96-97, 107, 111-112, 123 y 125 (Gráfico 7).

La mayor parte de los casos sin mutaciones en 70 y 91, tuvieron una gran presencia de estos polimorfismos.

Teniendo en cuenta los cambios de aminoácidos y de nucleótidos, todos los casos estaban alterados en 80 y 106; mientras que en 97 todas las secuencias estaban conservadas.

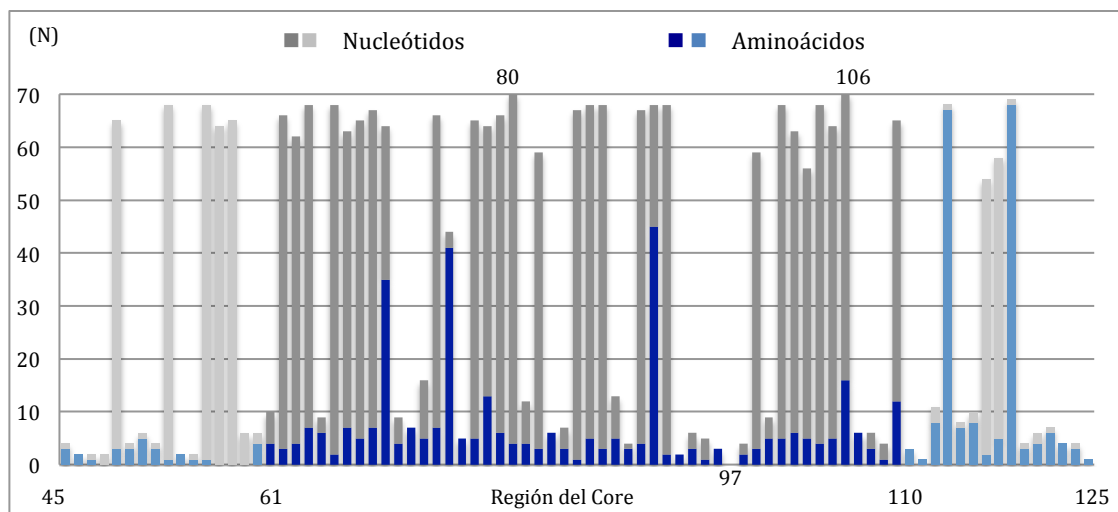


Gráfico 7 - Frecuencia de mutaciones de aminoácidos y nucleótidos de la región del Core

### 1.3.- Variabilidad genómica de la región NS5A

Todas las secuencias obtenidas se pueden ver en la figura 25.

Sólo el caso 6 tenía los mismos aminoácidos que la secuencia de referencia, todos los demás presentaban alguna mutación, especialmente, el caso 13 con 19 mutaciones, y los casos 24 y 38 con 18; con una mediana de 3 mutaciones (RIQ: 3-5,5).

En la región ISDR comprendida entre los aminoácidos 2209 y 2248, la mediana de mutaciones fue de 1 (RIQ:0-2,25), con 22 de las secuencias analizadas sin ninguna. Mientras que el caso 33 es el que presentaba mayor variabilidad con 10 mutaciones.

Entre los aminoácidos 2200-2208, las secuencias analizadas estaban bastante conservadas, aunque se han encontrado mutaciones, se observaron 62 casos no mutados (88,6%). En los casos 13, 24 y 38 casi toda la secuencia aparece mutada.

En el otro extremo, entre los aminoácidos 2249 y 2260, salvo en el caso 6 en todos los demás se observaron mutaciones, la mayoría con 2 ó 3 (64,3% y 20%, respectivamente).

Secuencia	2200	2210	2220	2230	2240	2250	2260
consenso	S	SSASQLSAPS	LKATCTTHHD	SPDADLIEAN	LLWRQEMGGN	ITRVESENKV	VVLDSFEPLR
Casos							
1.	C	-AF-KQT---	-----	A---P---	P-----	----P---	EL-VY-VT--
2.	-	-----	-----R-	-----	-----	-----	-I---D---
3.	-	-----	-----	-----F-	-----	-----	-I---D---
4.	-	-----	-----R-	-----	-----	-----	-I---D---
5.	-	-----	-----R-	-----	-----	-----	-I---D---
6.	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
7.	-	-----	-----AC-	-----V-	-----	-----	-I---D---
8.	-	-----	-----	-----N-	-----	-----	-I---D---
9.	-	-----	-----R-	-----	-----	-----	-I---D---
10.	-	-----	-----	-----	-----	-----	-I---D---
11.	G	Y-SLP--P--	-CS-----Y	-----	F-----	-----	I-----D--
12.	-	-----	-----F--RL-	-----Y-	-----D-	-I-----F-	-I-----Y-
13.	F	FYLINPGFK-	-----RN-	-----G-	-----E-	-----L-	-LDVW-----
14.	-	-----	-----	-----	-----	-----	-I---D---
15.	-	-----	-----R-	-----VH-	-----	-----	-FWH--D---
16.	-	-----	-----R-	-----	-----S-	-----	-I---D-I-
17.	-	-----	-----AR-	-----	-----	-----	-I---H---
18.	-	-----	-----	-----V-	-----	-----D---L	-I---D---
19.	-	-----	-----	-----	-----	-----	-I---D-RS
20.	-	-----	-S-----	-----	-----	-----	-I---D---
21.	-	-----F-	-----	-----D-	-----P---AV-	-----	-I---D---
22.	-	-----	-----R-	-----	-----	-----	-I---D---
23.	-	-----	-----R-	-----Y-	-----	-----	-I---D-K
24.	G	TLSTM-VLR-	-T-A---PY-	-Q-----	-----GS-	-----	-I---D---
25.	-	-----	-----	-----V-	-----	-----	-I---D---
26.	-	-----	-----	-----	-----	-----	I-----D--
27.	-	-----	-----	-----	-----	-----	-I---D---
28.	N	-----	-----	-----	-----	-----	-I---D---
29.	-	-----	-----	-----	-----	-----	-I---D-Q
30.	-	-----	-----R-	-----	-----	-----	-I---D---
31.	-	-----	-----R-	-----	-----	-----	-I---D---
32.	-	-----	-----	-----	-----	-----	-I---D-V
33.	-	-----T	-----S---R-	-Q-----	-----A-VI-RD	-----V--	-L---D-T
34.	-	-----	-----	-----	-----	-----	I-----D--
35.	-	-----	-----A-R-Y	-----	-----D-I	-----	-I---D-
36.	-	-----	-----	-----	-----	-----	-I---D-T
37.	-	-----	-----YI-D-	-----	-----H---D	-----T	-I-----AP
38.	-	LASLSSQCAA	P-----Q-	-----P---	P-----	-----G-----	---E---GE-
39.	-	-----	-----	-----	-----DV-	-----	-I---D---
40.	-	-----	-----	-----	-----	-----	II---D---
41.	-	-----	-----	-----	-----	-----	-I---D---
42.	-	-----	-Q-----	-----	-----	-----A	-I---D---
43.	-	-----	-----	-----	-----	-----	-I---D---
44.	-	-----	-----R-	-----	-----	-----	-I---D---
45.	-	-----	-----R-	-----	-----	-----	-I---D---
46.	-	-----	-----	-----	-----	-----	-I---D---
47.	-	-----	-----R-	-----	-----	-----IS-	-I---D---
48.	-	-----V-	-----	-----T	-----	-----	-S-----
49.	-	-----	-----R-	-----	-----	-----	-I---D---
50.	-	-----	-----AC-	-----TG-CC-T	I-----	-----	-----D-
51.	-	-----	-R-----N-	P---E---	-----	-----	-----D-TC
52.	-	-----	-----AR-H	-P-----	-----W-----	-----	I-M-----
53.	-	-----	-----R-	-----	-----	-----	-I---D---
54.	-	-----	-----R-	-----	-----	-----	-I---D---
55.	-	-----	-----R-	-----	-----	-----	-I---D---
56.	-	-----S-	-----RT	-----S	-----R-	-----S-	-I---D---
57.	-	-----	-----A	-----	-----	-----	-I---D---
58.	-	-----	-----R-	-----	-----	-----	-I---D---
59.	-	-----	-----	-----	-----	-----	I-----D--
60.	-	-----	-----	-----	-----	-----	-I---D---
61.	-	-----	-----AR-	-----	-----	-----	-I---D---
62.	-	-----	-----	-----	-----	-----	-I---D---
63.	-	-----	-----R-	-----	-----	-----	-I---D---
64.	-	-----	F-----SWN-	-----V---K	-----D	-----	-I---D---
65.	-	-----	-----	-----	-----	-----	-I---D---
66.	-	-----	-----	-----	-----	-----	-I---D---
67.	-	-----	-----	-----	-----	-----	-I---D---
68.	-	-----	-----A-	-----	-----	-----	-I---D---
69.	-	-----	-----R-	-----	-----	-----	-I---D---
70.	D	FAV-NSV--	-----	-----	-----	-----	I--G--D--

Figura 25 - Secuencias de la región NS5A (2200-2260 aa.) de los 70 pacientes. En AMARILLO: Región ISDR. En VERDE: Casos con RESPUESTA. En ROJO: Casos con FRACASO

La mayoría de las mutaciones encontradas fueron puntuales con una baja prevalencia (Gráfico 8). En los codones 2223, 2229, 2232-2233, 2241, 2243, 2247 y 2256 en todos los casos se observó el mismo aminoácido que en la secuencia de referencia. Mientras que en el codón 2257 con 63 casos mutados (90%) y en 2252 con mutaciones en el 84,3% (59 casos) presentaban la mayor tasa de mutación. En la región ISDR, fue en el codón 2218 con 31 casos mutados (44,3%).

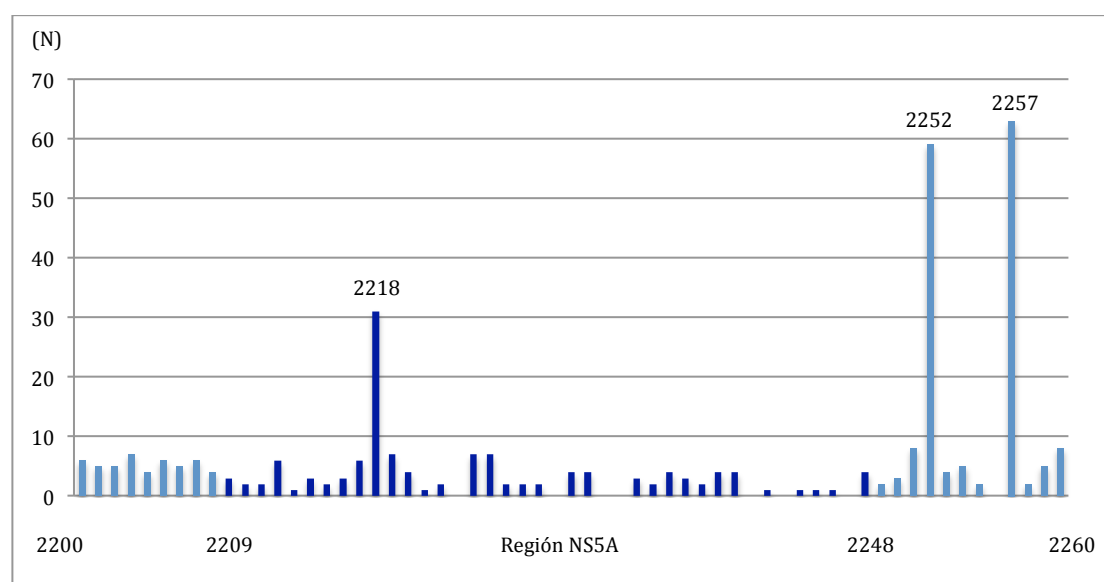


Gráfico 8 - Frecuencia de mutaciones en la región NS5A

Las frecuencias observadas en los codones con una mayor prevalencia de mutaciones eran debidas a la presencia de diversos aminoácidos (Gráfico 9).

En el codón 2257 se han observado 4 mutaciones distintas, pero en el 85,7% de los casos es debido a la sustitución del glutámico por aspartato (**E2257D**). Igualmente, 4 aminoácidos diferentes se detectaron en el codón 2252, con la presencia de isoleucina en vez de valina (**V2252I**) en el 77,1%.

En el aminoácido 2218, se detectaron 5 mutaciones diferentes, siendo la más frecuente, la expresión de arginina en vez de histidina (**H2218R**) presente en 26 casos (37,1%).

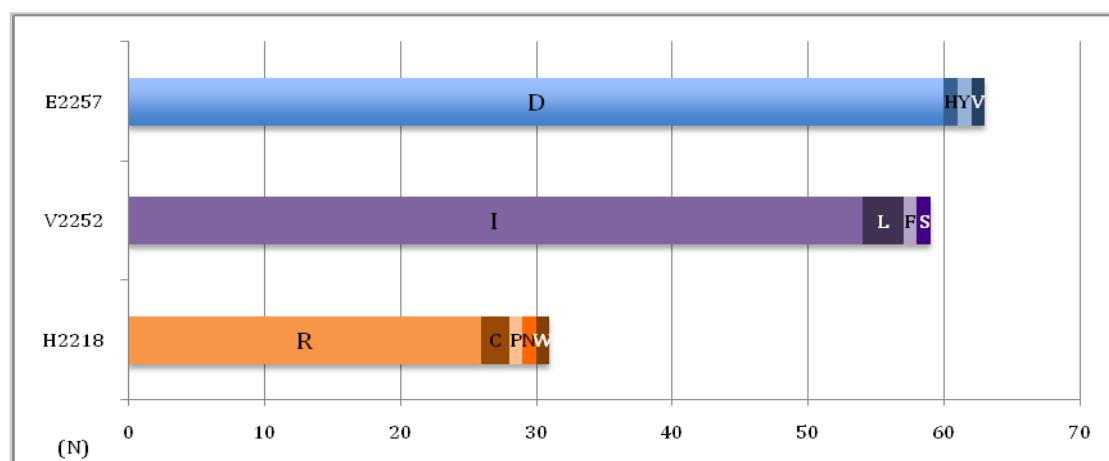


Gráfico 9 - Mutaciones más prevalentes la región del NS5A

Resultados preliminares del análisis de la prevalencia de mutaciones en esta región fueron presentados en el “53<sup>rd</sup>. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy” (ICAAC), (153).

Se observaron sustituciones en los nucleótidos que no implicaban cambio de aminoácidos, en mayor o menor medida en todos los casos (Gráfico 10).

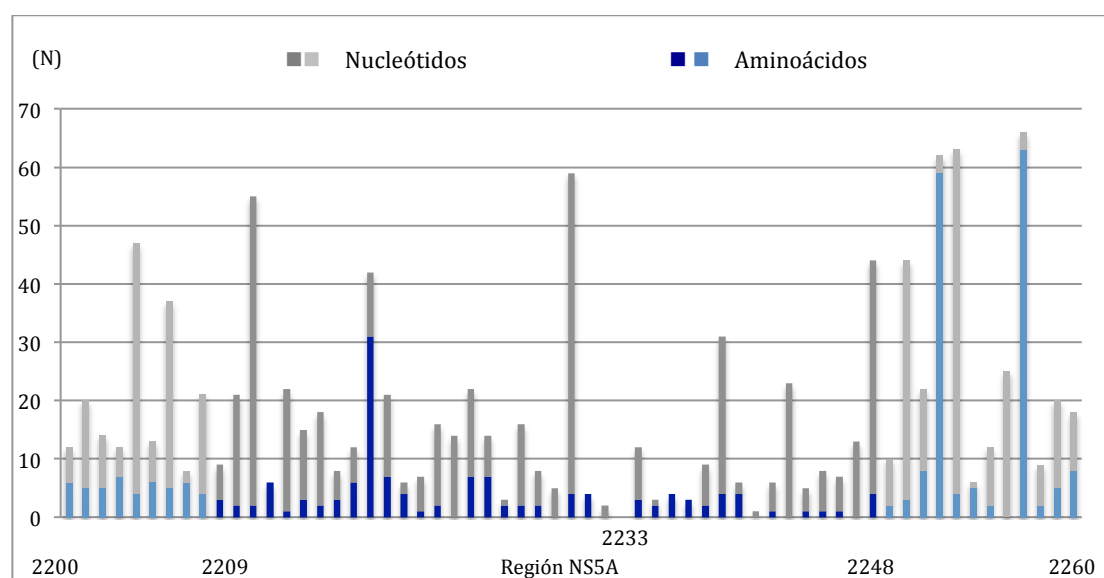


Gráfico 10 - Frecuencia de mutaciones de aminoácidos y nucleótidos en la región NS5A

Teniendo en cuenta además, estos polimorfismos, la posición 2233 es el único punto en el que todas las secuencias están preservadas, al no haberse encontrado ninguna mutación ni en los aminoácidos ni en los nucleótidos. En las demás

posiciones en las que no había mutaciones de aminoácidos, presentaban polimorfismos en los tripletes, sobre todo en 2256, 2243, 2247 y 2223.

En 2212, 2236 y 2237 no se han detectado sustituciones de nucleótidos. Mientras que la mayor prevalencia de ellos se da en 2253, donde en 58 de los 66 casos con leucina presentaban tripletes diferentes al de la secuencia de referencia. Igual que en 55 de los 66 casos con asparagina en 2230, y en 53 de los 68 casos con leucina en 2211.

## 2.- ANÁLISIS DEL IMPACTO EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Se analizaron los datos de respuesta de los 39 pacientes que finalizaron el tratamiento. Los 11 pacientes que habían alcanzado RVS se incluyeron en el grupo de respondedores (28,2%), mientras que los otros 28 casos constituyeron el grupo de fracaso terapéutico (71,8%), (Figura 26).

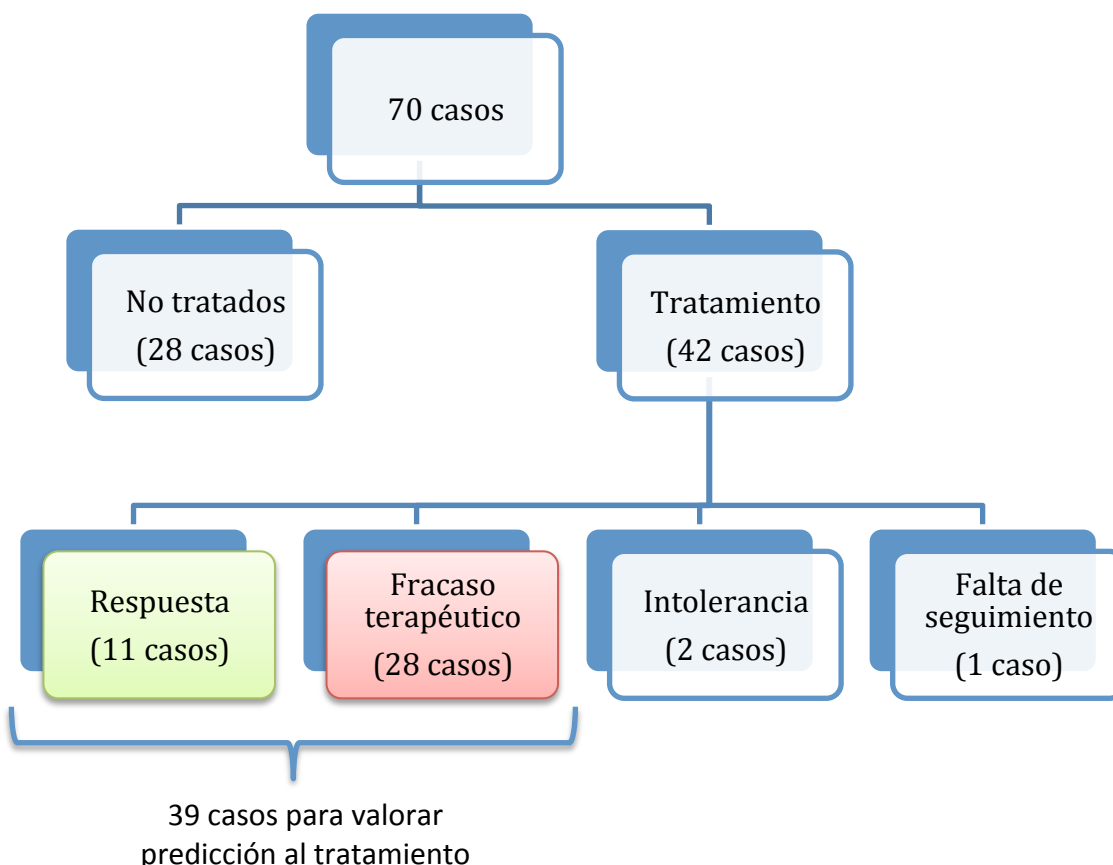


Figura 26 – Distribución según la indicación de tratamiento y su respuesta



## 2.1.- Descripción del grupo de pacientes tratados

Recibieron tratamiento 20 mujeres y 19 varones, con edades comprendidas entre 33 y 70 años y una media de edad de 57,85 años (DE:7,89). La mayoría, españoles (82,1%), aunque 4 casos procedían de Rumanía, y otros tres de Bulgaria, Rusia y Ecuador (1 caso procedente de cada país).

No hubo ningún caso de coinfección con VIH.

## 2.2- Estudio de variables epidemiológicas

En cuanto a la **nacionalidad**, en ambos grupos, y al igual, que en el conjunto de la muestra, la mayoría eran pacientes españoles. En el grupo de respondedores, cuatro casos, presentaban una nacionalidad diferente: Rumanía, Rusia, Bulgaria y Ecuador. En el de no-respondedores, 3 casos, procedentes de Rumanía.

Con respecto al **sexo**, la mayoría tanto de varones como de mujeres no respondieron al tratamiento, aunque parece que los hombres tuvieron una peor respuesta (el 84,2% no alcanzaron RVS frente al 60% de las mujeres), estas diferencias rozan al nivel de significación ( $p=0,093$ ), (Gráfico 11).

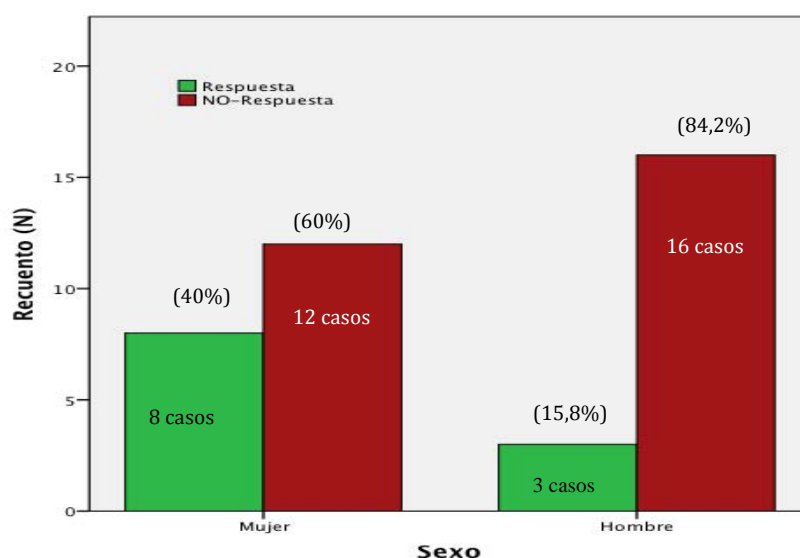


Gráfico 11 - Distribución según sexo en Respondedores y No-Respondedores

La media de **edad** de los pacientes que siguieron tratamiento fue de 57,85 años (DE:7,89). La edad de aquellos que respondieron fue significativamente menor que la de los pacientes con fracaso ( $52,36 \pm 10,46$  años vs.  $60 \pm 5,48$  años;  $p=0,040$ ), (Gráfico 12).

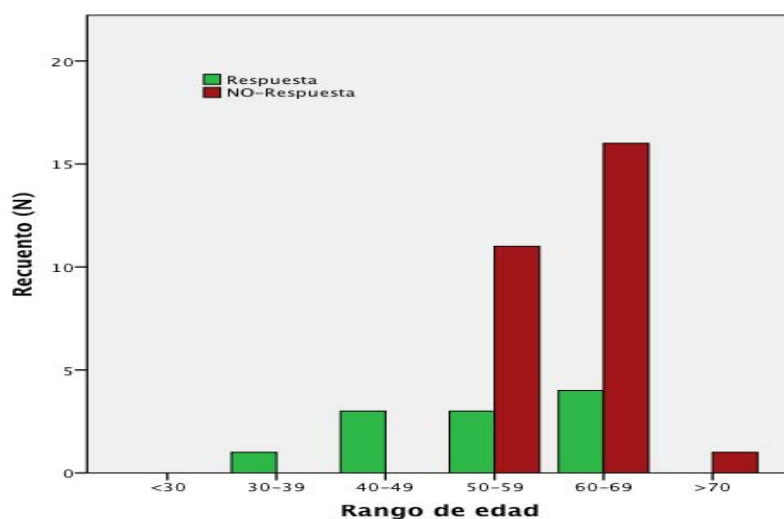


Gráfico 12 - Distribución según edad en Respondedores y No-Respondedores

Estableciendo el punto de corte en los 45 años, las diferencias fueron más marcadas. Todos aquellos con una edad inferior alcanzaron RVS, observándose fracaso sólo en el grupo con 45 años o más ( $p=0,018$ ), (Gráfico 13).

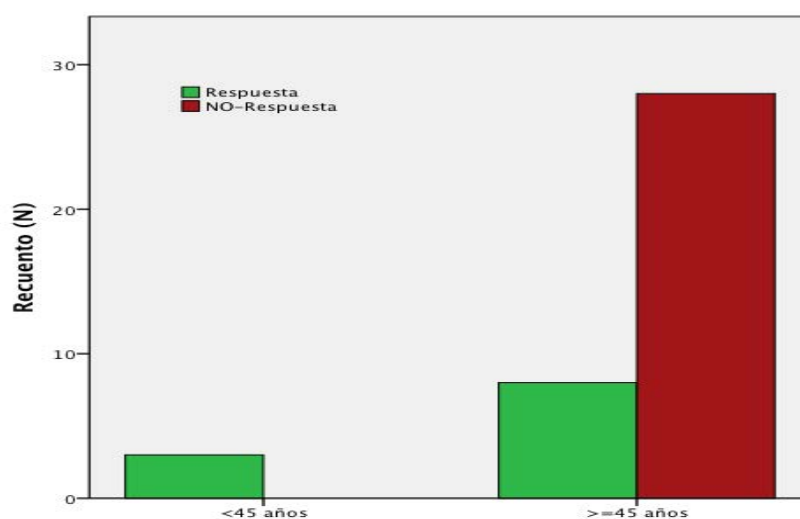


Gráfico 13 – Distribución según edad, con el punto de corte en 45 años, en Respondedores y No-Respondedores

## 2.3.- Estudio de variables dependientes del virus

### 2.3.1.- CARGA VIRAL BASAL

En los 39 pacientes que siguieron tratamiento, la mediana de la carga viral fue de 2.276.063 UI/ml. (RIQ:722.519–5.637.857), con una carga mínima de 5.027 UI/ml. y máxima de 43.689.191 UI/ml. Sólo 6 casos presentaban una carga  $\leq 400.000$  UI/ml.

La mediana de la carga viral de los que respondieron al tratamiento fue de 2.039.818 UI/ml. (RIQ:21.816-3.077.243), y de 3.029.122 UI/ml. (RIQ:1.393.772-6.820.528,5) en el grupo de no-respondedores.

La mayoría de los casos con fracaso (92,9%) tenían cargas virales  $> 400.000$  UI/ml. Encontrando asociación entre una carga viral elevada ( $> 400.000$  UI/ml.) y una peor respuesta (78,8% vs. 33,3% con carga baja,  $p=0,042$ ), (Gráfico 14).

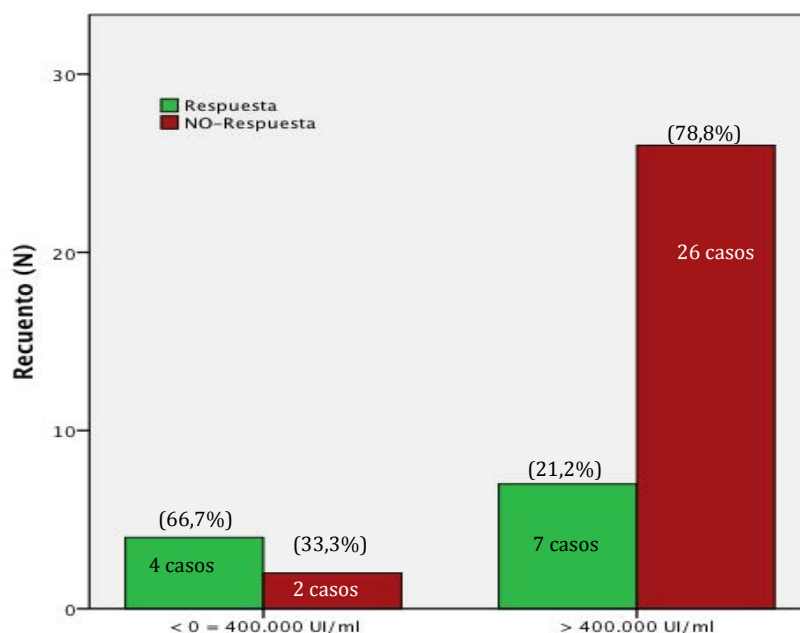


Gráfico 14 - Distribución de la carga viral basal en Respondedores y No-Respondedores

### 2.3.2- ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES DE LA REGIÓN DEL CORE

#### 2.3.2.1.- Características la región del Core en los pacientes tratados

Analizando las secuencias del Core de los 39 pacientes que recibieron tratamiento (secuencias en rojo y verde de la figura 24), en todos ellos se encontró alguna mutación. Considerando las secuencias completas, se encontraron entre 3 y 28 mutaciones, con una mediana de 6 mutaciones (RIQ:5-10). Y, entre 1 y 18 mutaciones en la región central (61-110 aa.), con una mediana de 4 mutaciones (RIQ:3-5).

Tanto en los casos que respondieron al tratamiento como en los de fracaso, lo más frecuente fue encontrar entre 1-5 mutaciones entre los aminoácidos 61-110 (Gráfico 15). Los 3 casos con más mutaciones estaban en el grupo de respondedores (casos 12, 55 y 58). No se ha encontrado relación entre el número de mutaciones entre los aminoácidos 61-110 y la respuesta al tratamiento ( $p=0,529$ ).

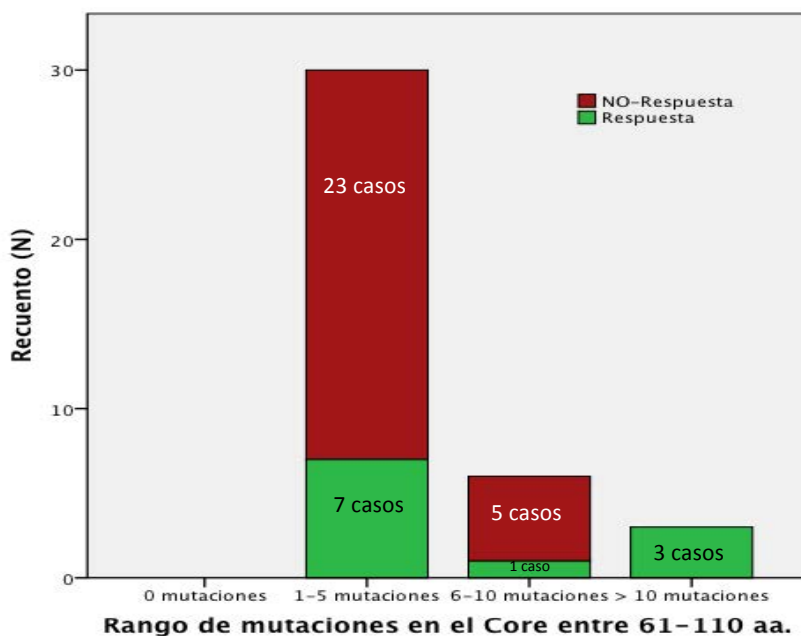


Gráfico 15 - Distribución según el número de mutaciones entre los aminoácidos 61-110 del Core en Respondedores y No-Respondedores

Al igual que en el total de la muestra, la mayor prevalencia de mutaciones se encontró entre los aminoácidos 111-124, en los codones 114 y 119, donde sólo 2 casos presentaban el mismo aminoácido que la secuencia de referencia (Gráfico 16).

No se encontraron mutaciones en las posiciones 48, 57-59 y 97, pero tampoco en 66, 95 y 112. Y, al igual que en el total de la muestra, la mayoría son mutaciones puntuales.

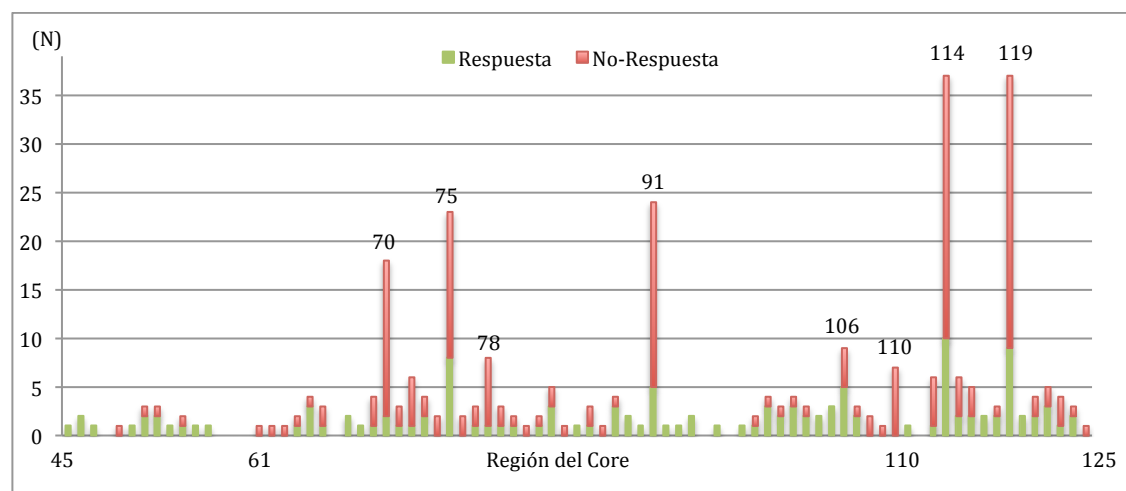


Gráfico 16 - Frecuencia de mutaciones en la región del Core en los pacientes tratados

Tanto en el grupo de respondedores como en el de fracaso se observaron mutaciones en casi toda la región. Sin embargo, todas las mutaciones presentes en 49, 60-62, 74, 76, 81, 84, 87, 108-110 y 125 sólo se observaron en el grupo de falta de respuesta. Y las mutaciones en 45-47, 50, 53, 55-56, 67-68, 85, 89-90, 92-94, 96, 98, 104-105, 111, 117 y 120 sólo aparecen en el grupo de respondedores.

#### 2.3.2.2.- Análisis de las mutaciones más prevalentes entre los aminoácidos 61-110 de la región del Core.

La mayor tasa de mutaciones en esta región se observó en el aminoácido 91, 75, 70, 106, 78 y 110, según su prevalencia.

- MUTACIONES EN EL AMINOÁCIDO 91 (Core91)

La sustitución de leucina por metionina en el aminoácido 91 (**L91M**) es la mutación más prevalente, presente en el 64,3% de los no-respondedores y en el 45,5% de los respondedores. Histidina (**L91H**) se ha observado únicamente en un caso con fracaso (Gráfico 17).

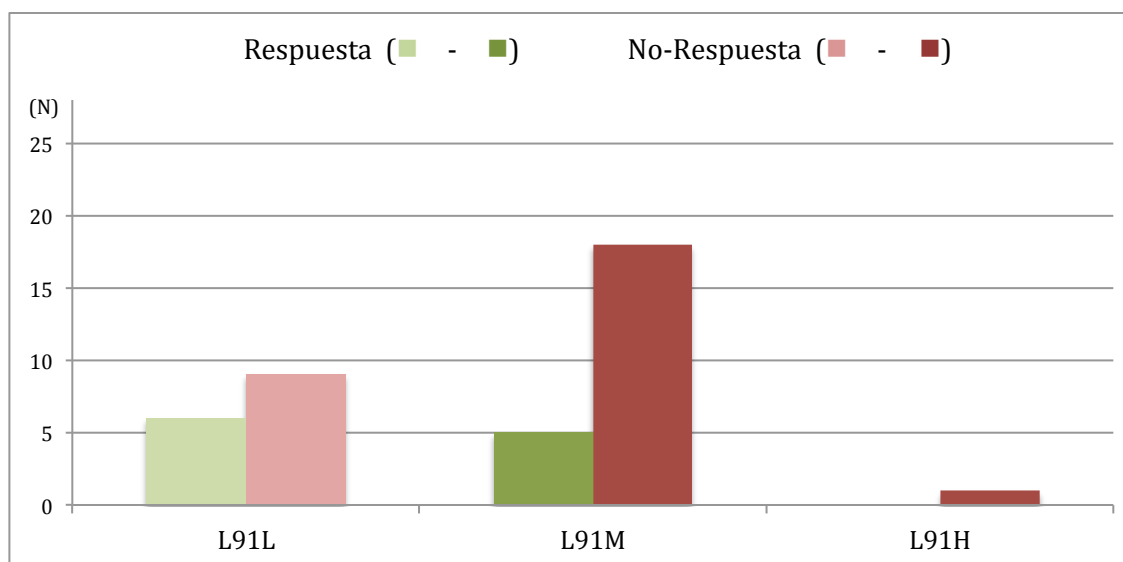


Gráfico 17 - Mutaciones en el Core91 en Respondedores y No-Respondedores

La presencia de metionina no se ha relacionado con fracaso al tratamiento: el 60% de aquellos con leucina no respondieron al tratamiento frente al 78,3% de aquellos con metionina (OR:2,40, IC95%:0,57-10,04;  $p=0,285$ ). Las sustituciones, ya sea por metionina o por histidina (el 79,2% no alcanzaron RVS), tampoco se han relacionado con el fracaso (OR:2,53, IC95%:0,61-10,56;  $p=0,277$ ).

- MUTACIONES EN EL AMINOÁCIDO 75 (Core75)

En 75 se observó una mayor variabilidad. La sustitución de treonina por valina (**T75V**) o fenilalanina (**T75F**) sólo se detectó en el grupo de respondedores, mientras que por serina (**T75S**), aspartato (**T75D**) o tirosina (**T75Y**) sólo en el grupo de fracaso (Gráfico 18).

La mutación más prevalente en este codón es debida a la expresión de alanina (**T75A**), presente tanto en el grupo de respuesta (6 casos), como en aquellos con fracaso (12 casos).

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre aquellos con treonina (81,3% no alcanzaron RVS), y aquellos con alanina (66,7% no respondieron al tratamiento), ( $p=0,448$ ); ni con aquellos con cualquier sustitución (en el 65,2% no hubo respuesta), ( $p=0,471$ ).

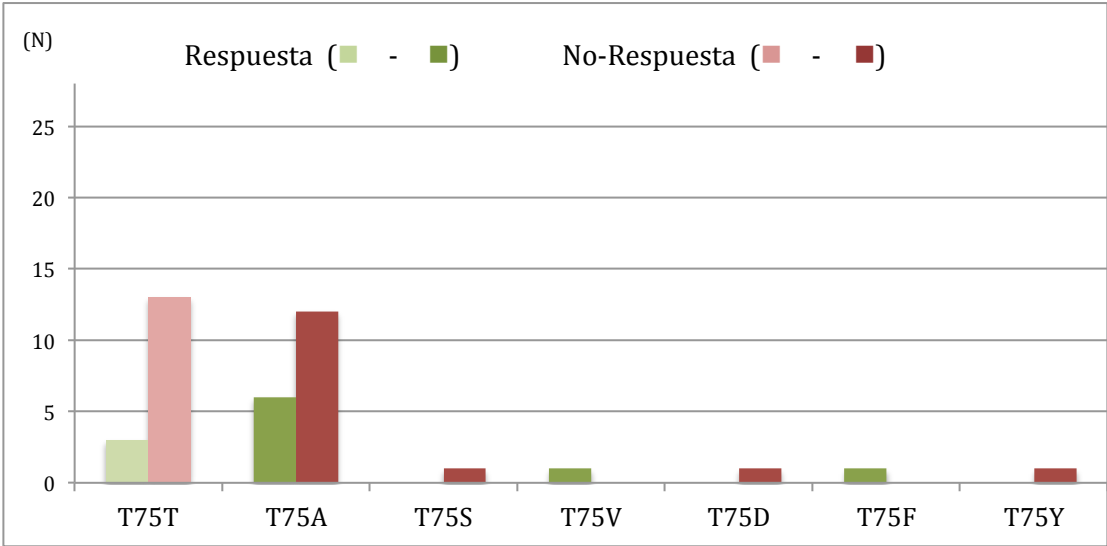


Gráfico 18 - Mutaciones en el Core75 en Respondedores y No-Respondedores

- MUTACIONES EN EL AMINOÁCIDO 70 (Core70)

En el aminoácido 70 (Core70), se detectó glutamina (**R70Q**) en 15 casos con fracaso y sólo en 2 casos de los que respondieron favorablemente. Mientras que glicina (**R70G**) apareció en un único caso que no respondió al tratamiento (Gráfico 19).

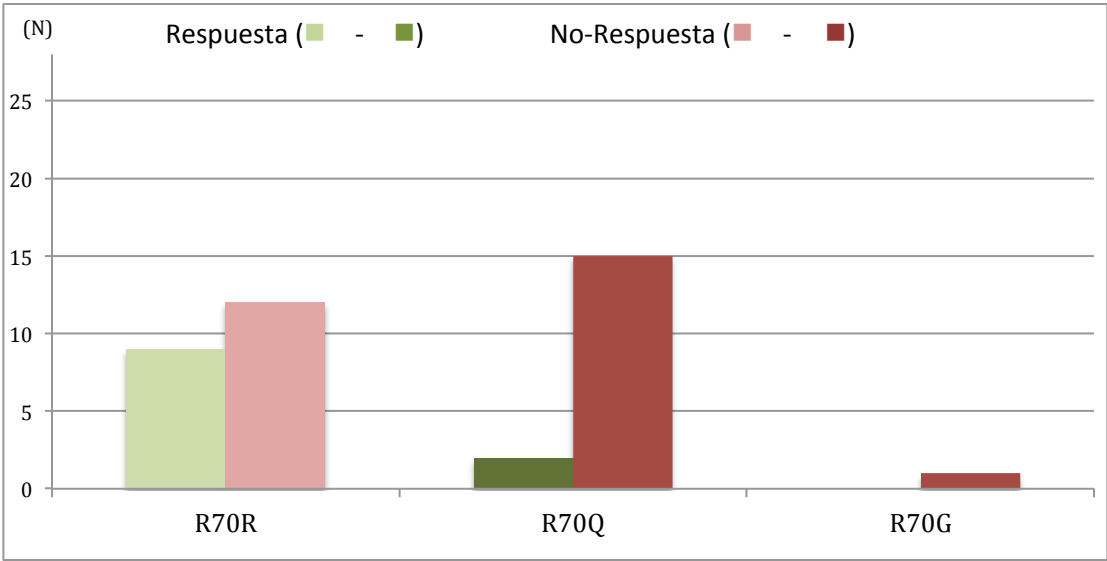


Gráfico 19 - Mutaciones en el Core70 en Respondedores y No-Respondedores

El 88,2% de los que presentaban glutamina en el aminoácido 70 no respondieron, frente al 57,1% de los expresan arginina, encontrando una mayor probabilidad de fracaso en los casos mutados (OR: 5,62, IC95%: 1,02-31,10;  $p=0,070$ ).

Si se analizan las mutaciones conjuntamente, la presencia de sustituciones, ya sea por glutamina o glicina) estaría relacionado con una peor respuesta: El 88,9% de ellos no respondieron favorablemente (OR: 6,00, IC95%: 1,09-33,02;  $p=0,028$ ).

- MUTACIONES EN EL AMINOÁCIDO 106 (Core106)

En el aminoácido 106, se encontraron diversas mutaciones puntuales. Un total de 9 casos mutados y 6 aminoácidos diferentes (Gráfico 20). Aspartato (**S106D**), tirosina (**S106Y**), y treonina (**S106T**) están presentes únicamente en el grupo de fracaso; mientras que asparagina (**S106N**) y valina (**S106V**), en el de respuesta. La sustitución por cisteína es la única presente en ambos grupos. Sin que se observaran diferencias estadísticamente significativas.

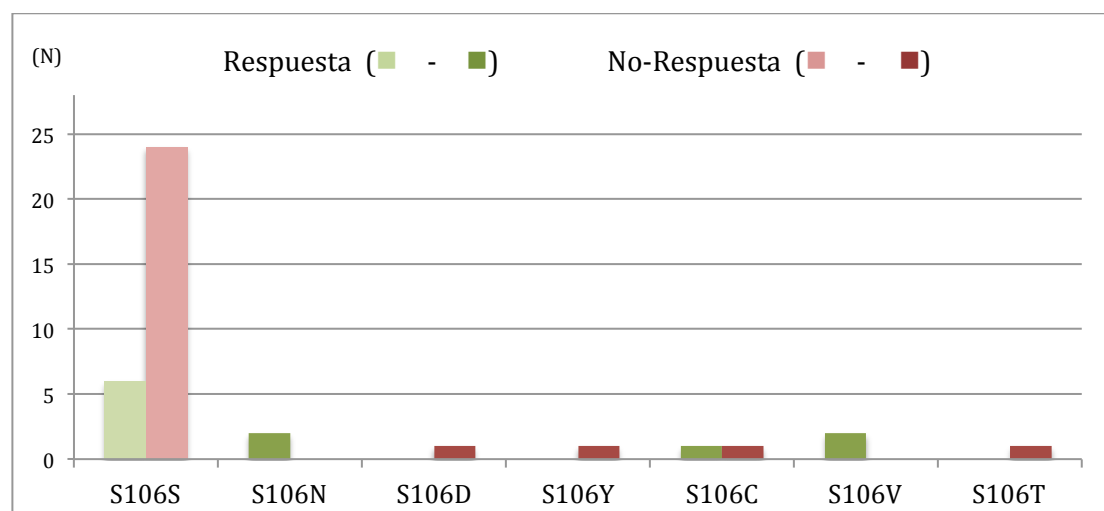


Gráfico 20 - Mutaciones en el Core106 en Respondedores y No-Respondedores

- MUTACIONES EN EL AMINOÁCIDO 78 (Core78)

Entre los que respondieron sólo se encontró un caso mutado, con la expresión de arginina (**Q78R**). El resto de las mutaciones con histidina, asparagina y leucina (**Q78H**, **Q78N** y **Q78L**) se vieron únicamente entre los casos con fracaso (Gráfico 21).



La mutación que aparece con mayor frecuencia es debida a la expresión de histidina (Q78H), sin que se haya observado relación con la respuesta al tratamiento ( $p=0,293$ ).

El 87,5% de aquellos con sustituciones no respondieron al tratamiento, frente al 67,7% de aquellos con glutamina, sin que estas diferencias sean significativas ( $p=0,400$ ).

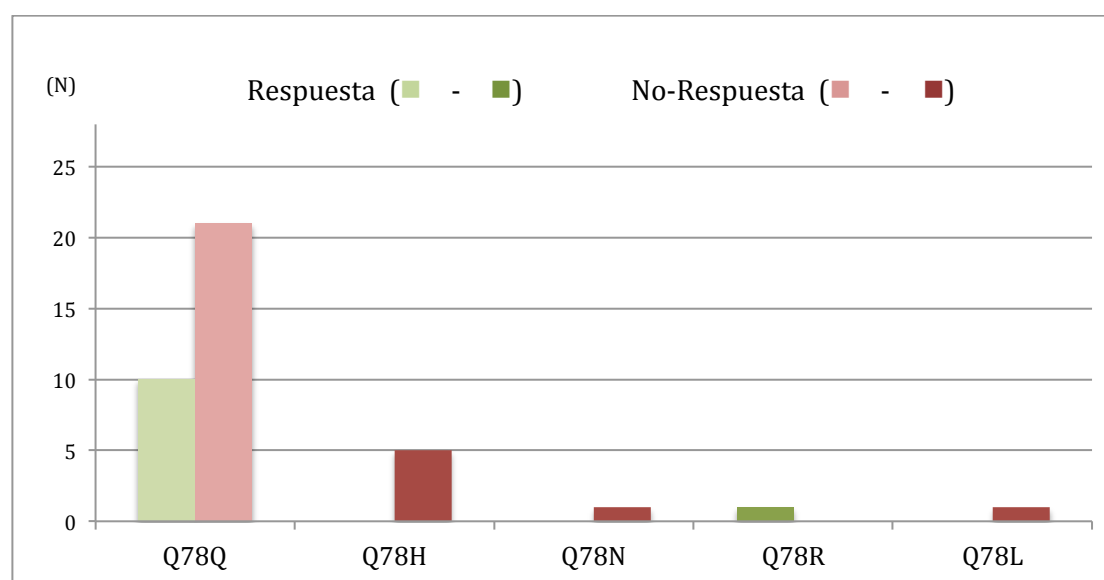


Gráfico 21 - Mutaciones en el Core78 en Respondedores y No-Respondedores

- MUTACIONES EN EL AMINOÁCIDO 110 (Core110)

Todos los casos mutados en 110 se dan entre el grupo de fracaso (Gráfico 22). Se han observado diversas mutaciones con serina (**T110S**), glutamina (**T110Q**), glicina (**T110G**), arginina (**T110R**); siendo la más frecuente la debida a asparagina (**T110N**) sin que se haya relacionado con la respuesta al tratamiento ( $p=0,536$ ).

Analizando las sustituciones conjuntamente y aunque todos los casos mutados se encuentren en el grupo de fracaso, no se han establecido diferencias estadísticamente significativas frente a aquellos con treonina (65,6% no alcanzaron RVS), ( $p=0,159$ ).

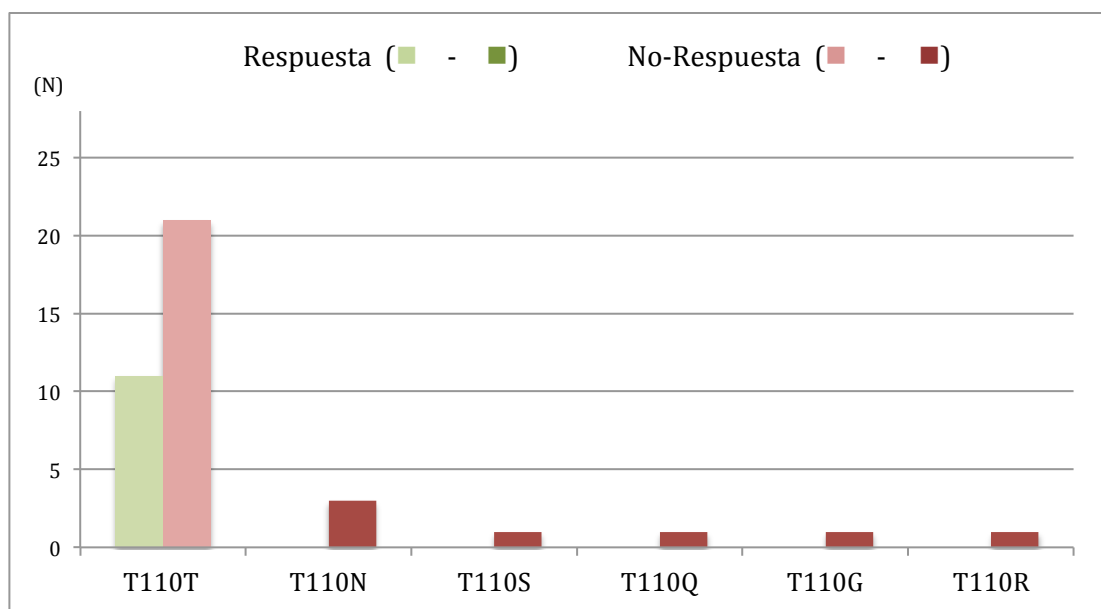


Gráfico 22 - Mutaciones en el Core110 en Respondedores y No-Respondedores

- OTRAS MUTACIONES

Se analizó la presencia de sustituciones en el resto de los codones, y de manera específica el resto de las mutaciones encontradas, sin que se estableciera relación con la respuesta al tratamiento.

### 2.3.3.- ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES DE LA REGIÓN NS5A

#### 2.3.3.1.- Características de la región NS5A en los pacientes tratados.

Si se analizan las secuencias de los 39 casos que recibieron tratamiento (secuencias en rojo y verde de la figura 25), además de los codones en los que no se habían encontrado mutaciones en el total de la muestra, en este grupo de pacientes, tampoco se observaron mutaciones en 2202, 2209-2210, 2214, 2221-2222, 2226, 2237, 2244-2246, 2249, 2254-2255 y 2258 (Gráfico 23).

La mayor tasa de mutación se da en 2257 (36 casos: 9 con RVS y 27 con fracaso), en 2252 (35 casos: 9 respondedores y 26 con fracaso); y, en la región ISDR en 2218 (17 casos: 4 con RVS y 13 con fracaso).

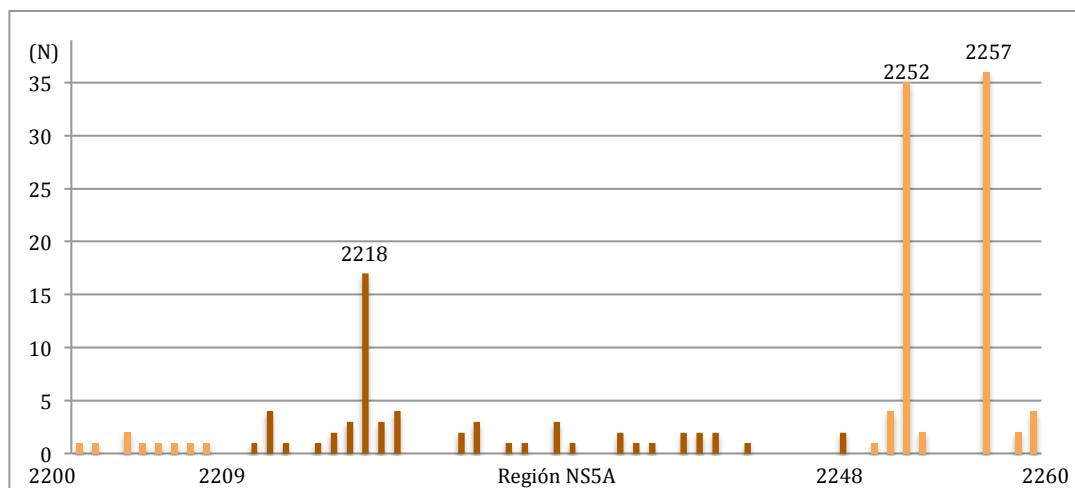


Gráfico 23 - Frecuencia de mutaciones en la región NS5A en los pacientes tratados

Analizando la secuencia completa, en todos los casos excepto en el 6, se observaron mutaciones (mediana de 3 mutaciones; RIQ: 3-4). El caso 11 es el que presenta una mayor variabilidad con 12 mutaciones.

Entre los aminoácidos 2200-2208, sólo hubo 3 casos con mutaciones (1 con 6 y los otros dos con una sola mutación). En el otro extremo, entre los aminoácidos 2249-2260, la mayoría presentaban 2 ó 3 mutaciones (74,4% y 17,9%, respectivamente).

En la región ISDR se encontraron entre 0 y 7 mutaciones, con una mediana de 1 (RIQ: 0-2), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas en el número de mutaciones entre el grupo de respondedores y el de fracaso, ( $p=0,753$ ), (Gráfico 24).

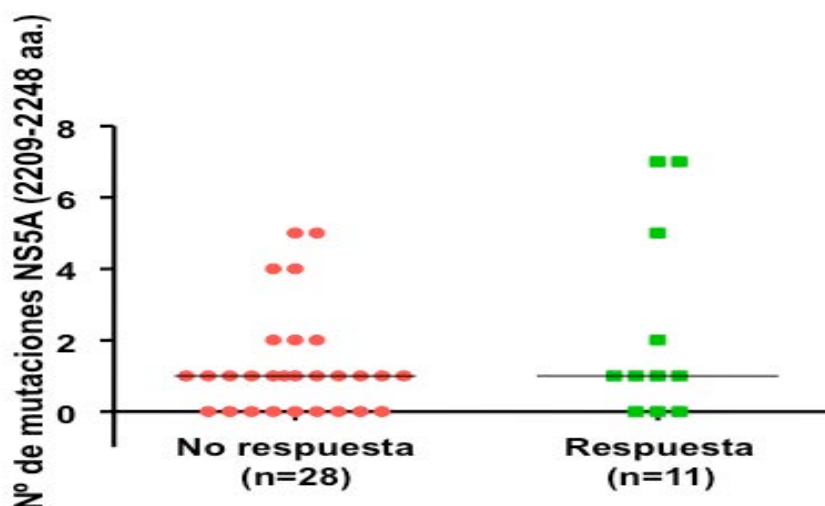


Gráfico 24- Distribución del número de mutaciones en la región ISDR en Respondedores y No-Respondedores

### 2.3.3.2.- Descripción y análisis de la variante salvaje y mutante de la región ISDR

En total se observaron 12 casos sin ninguna mutación en esta región, de los cuales el 75% no respondieron. Y, 16 casos con 1 única mutación, presentando el mismo comportamiento que aquellos sin mutaciones (75% con fracaso). Se consideró, por tanto, como variante salvaje del virus a aquellos con 1 o ninguna mutaciones; y, variante mutante a aquellos con 2 o más mutaciones.

En los 70 pacientes que componen el conjunto de la muestra, el 34,3% presentaba 1 mutación y el 31,4% no presentaba ninguna. El resto de los casos presentaban múltiples mutaciones con un máximo de 10. El 65,7% por tanto estarían infectados por la variante salvaje del virus, mientras que poco más de un tercio presentaría la variante mutante (Gráfico 25).

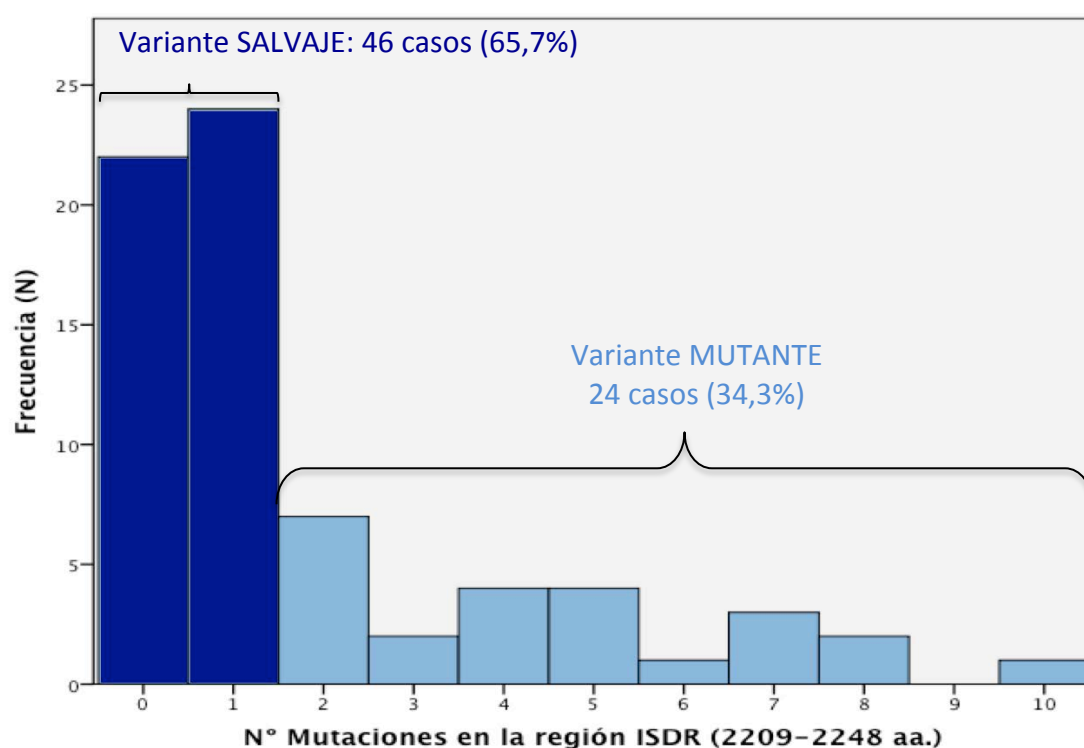


Gráfico 25 - Distribución según el número de mutaciones en la región ISDR en los 70 pacientes

Los pacientes que siguieron tratamiento también presentaron un claro predominio de la variante salvaje (Gráfico 26).

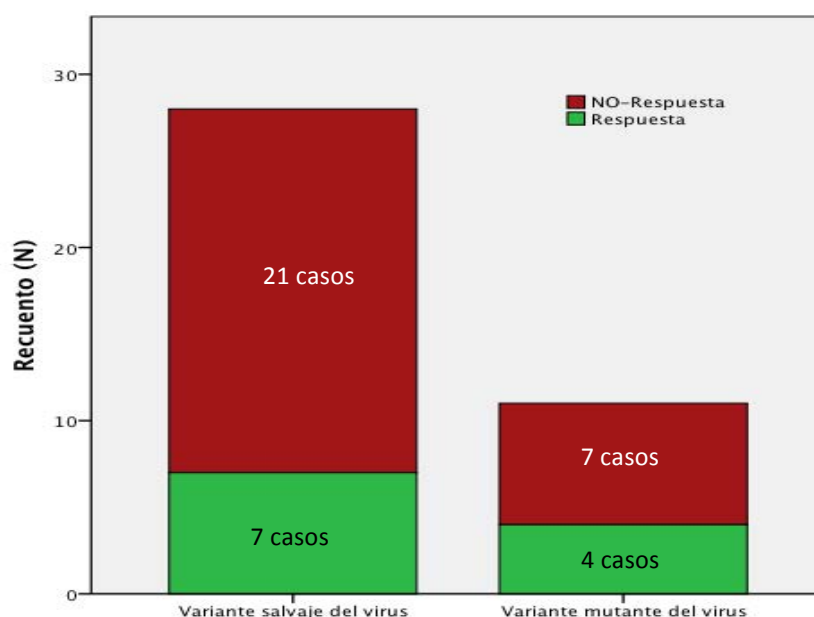


Gráfico 26 – Variante salvaje y mutante de la región ISDR en Respondedores y No-Respondedores

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre aquellos con la variante salvaje (75% no alcanzaron RVS) y aquellos con la variante mutante (63,6% no respondieron), ( $p=0,694$ ).

#### 2.3.4.- ANÁLISIS CONJUNTO DE AMBAS REGIONES: SUSTITUCIONES EN EL CORE70 Y MUTACIONES EN LA REGIÓN ISDR

Considerando la región ISDR en relación con la presencia o no de sustituciones en el aminoácido 70 del Core, 11 de los 12 casos (91,7%) que no respondieron al tratamiento a pesar de no tener mutaciones en el Core70 presentaban la variante salvaje en la región ISDR (Tabla 1).

**Tabla 1 – Distribución de la variante de la región ISDR ante la presencia de sustituciones en el Core70 en Respondedores y No-Respondedores**

	RESPUESTA	NO-RESPUESTA	TOTAL
Arginina en 70 (R70R)	9 casos	12 casos: -V. salvaje: 11 casos (91,7%) -V. mutante: 1 caso	21 casos
Sustituciones en 70 (R70Q/G)	2 casos: -V. salvaje: 1 caso -V. mutante: 1 caso	16 casos	18 casos

Por el otro lado, 6 de los 7 casos (85,7%) que no respondieron al tratamiento a pesar de tener la variante mutante presentaban sustituciones en el aminoácido 70 de la región del Core, (Tabla 2).

**Tabla 2 – Presencia de sustituciones en el Core70 ante la variante de la región ISDR en Respondedores y No-Respondedores**

	RESPUESTA	NO-RESPUESTA	TOTAL
V. SALVAJE en el ISDR	7 casos: - R70R: 6 casos (85,7%) - R70Q/G: 1 caso	21 casos	28 casos
V. MUTANTE en el ISDR	4 casos	7 casos: - R70R: 1 caso - R70Q/G: 6 casos (85,7%)	11 casos

Se analizó, por tanto, la respuesta al tratamiento teniendo en cuenta ambas regiones: la presencia o no sustituciones en el aminoácido 70 del Core (Core70) y el número de mutaciones en la región ISDR según se trate de la variante salvaje o mutante (Figura 27).

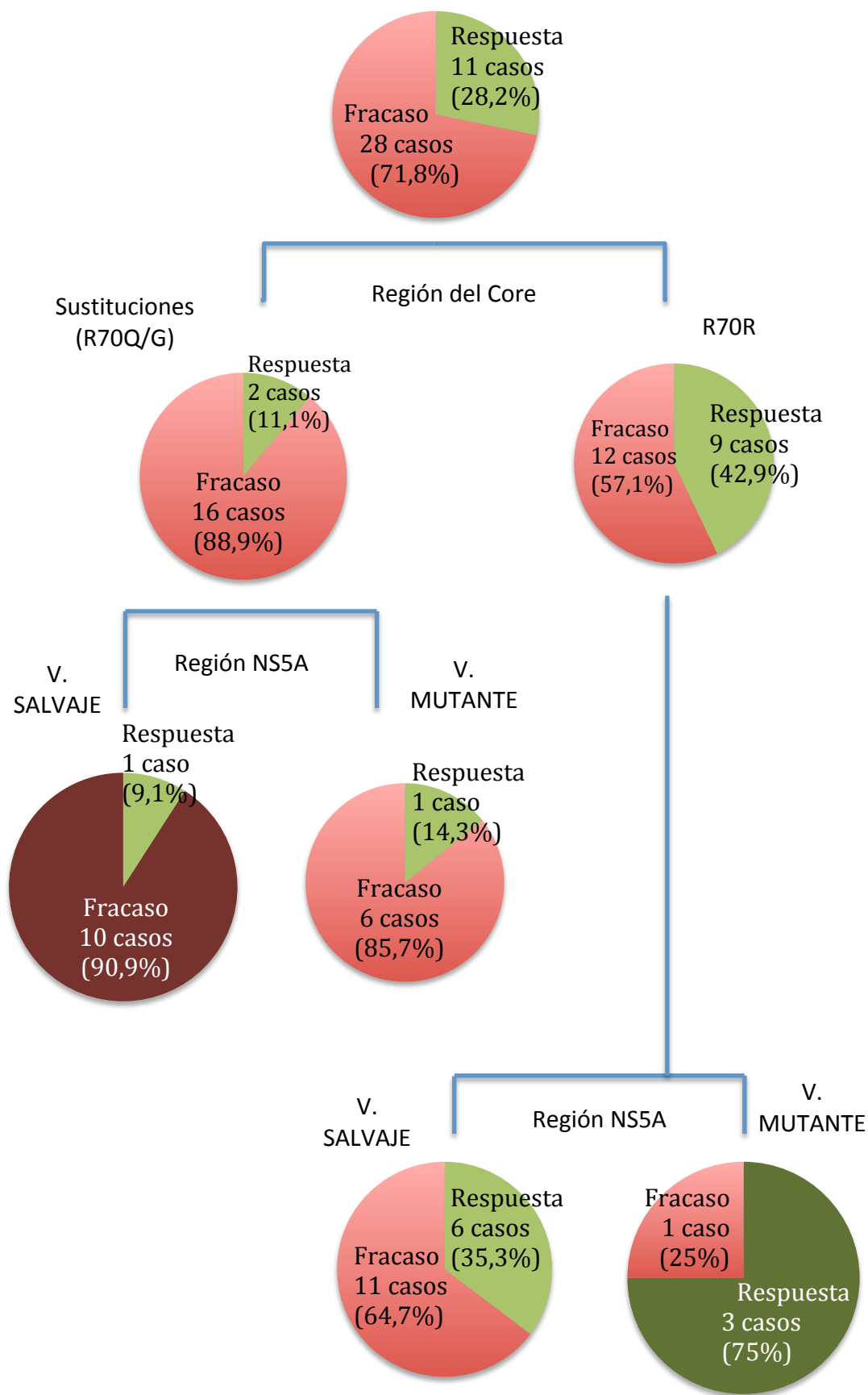


Figura 27 – Análisis de la respuesta al tratamiento en función de la presencia de sustituciones en el Core70 y la variabilidad en la región NS5A

El 90,9% de aquellos pacientes que presentaban mutaciones en el Core70 y además la variante salvaje, no alcanzó RVS (sólo 1 caso en esta situación respondió al tratamiento). El 75% de los casos sin mutaciones en el Core70 y con la variante mutante tuvieron una respuesta favorable (sólo 1 caso no respondió).

El 85,7% de los que presentaban sustituciones en el Core70 aún con la variante mutante no respondieron al tratamiento. El 64,7% si no hay sustituciones en el Core70, pero con la variante salvaje en el ISDR.

En el análisis estratificado (Gráfico 27), se ha encontrado asociación con el fracaso entre aquellos con sustituciones en el Core70 y la variante salvaje frente a aquellos con Arginina en el Core70 y la variante mutante (OR: 30; IC95%: 1,41-638,15;  $p=0,029$ ).

Aquellos con sustituciones en el Core70 pero con la variante mutante, presentaron una mayor probabilidad de fracaso frente aquellos con ambas regiones favorables, aunque estas diferencias rozan el nivel de significación estadística (OR:18; IC95%: 0,81-399,15;  $p=0,068$ ).

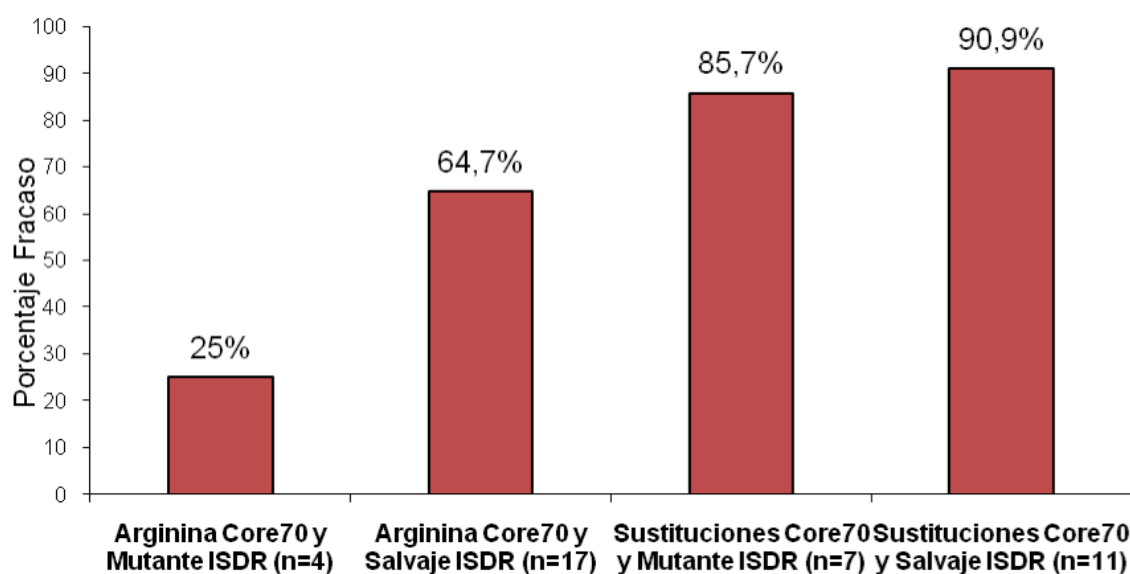


Gráfico 27 - Porcentaje de fracaso según la presencia de sustituciones en el Core70 y la variabilidad en el ISDR



Aquellos con Arginina en Core70 pero con la variante salvaje tendrían una OR para fracaso 5,5 (IC95%: 0,464-65,162) sin que se trate de diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,177$ ).

Con el objetivo de estudiar la contribución en la predicción del fracaso del número de mutaciones en el ISDR a las sustituciones del Core70 se calculó un modelo de regresión logística obteniendo las probabilidades predichas cuando estaba presente sólo la variable sustituciones del Core70, y cuando se introducía en el modelo el número de mutaciones del ISDR (Gráfico 28). Teniendo en cuenta la presencia de sustituciones en el aminoácido 70 del Core para predecir el fracaso al tratamiento, se estima un área bajo la curva de 0,695 (IC95%: 0,51-0,87;  $p=0,061$ ). Si además, se tiene en cuenta el número de mutaciones en la región ISDR, el área bajo la curva sería de 0,745 (IC95%: 0,87-0,92;  $p=0,018$ ).

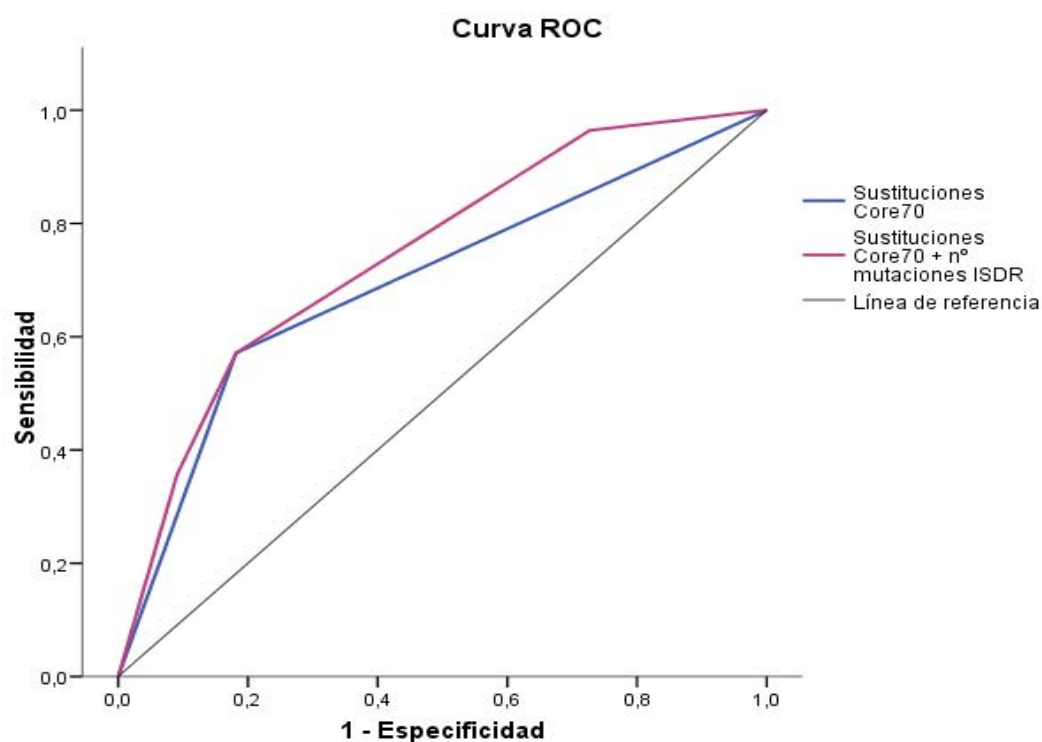


Gráfico 28 - Probabilidad pronóstica de fracaso ante sustituciones en el Core70 y al añadir la variabilidad de la región ISDR

En el modelo ajustado por las dos regiones la presencia de sustituciones en el Core70 se relacionó de manera estadísticamente significativa con el fracaso (OR: 8,87; IC95%: 1,29-60,76;  $p=0,026$ ). La presencia de ninguna o una mutación en la región ISDR se relacionó con una peor respuesta sin alcanzar el nivel de significación estadística (OR: 3,46; IC95%: 0,54-22,02;  $p=0,188$ ).

Con el estudio conjunto de ambas regiones, se consigue incrementar en un 7% el área bajo la curva, aunque no de manera significativa ( $p=0,1982$ ), (Gráfico 28).

## V. Discusión

Hasta hace poco, el tratamiento estándar de los pacientes con infección crónica por el VHC, consistía en el uso combinado de peg-IFN y RBV. Los efectos secundarios derivados del mismo suponen una disminución en la calidad de vida de los pacientes, y obligan a suspenderlo en algunas ocasiones.

Además, la tasa de respuesta al tratamiento es muy heterogénea, dependiendo fundamentalmente del genotipo viral. Entre ellos, es el genotipo 1b, el que presenta tasas más bajas de respuesta (98, 102) y, a su vez, el de mayor prevalencia en nuestro medio, al igual que en el resto de Europa (26, 28, 29, 31, 33).

En este sentido, se han buscado marcadores predictores de respuesta al tratamiento, con el fin de identificar a los pacientes se benefician del mismo, permitiendo individualizar la indicación y la pauta.

Múltiples factores, tanto dependientes del virus como del huésped, han sido estudiados. Sin que ninguno haya conseguido hasta ahora la fiabilidad suficiente para ser utilizados de manera aislada antes de iniciar el tratamiento.

En nuestro estudio, se analizan dos regiones del virus, la región del Core y la región NS5A, para conocer las características genómicas virales en nuestra población y analizar si pueden ser utilizados como marcadores predictivos de la respuesta favorable o desfavorable.

Al mismo tiempo, se ha analizado también otro factor dependiente del virus, la carga viral basal; y de los factores dependientes del huésped, la edad y el sexo, como posibles marcadores relacionados con la respuesta.

La **edad** es uno de los factores dependientes del huésped, que ha sido considerado por numerosos autores como factor predictivo de RVS. De modo que la población de menor edad sería la que tendría una mejor respuesta al tratamiento (108, 110, 114-116).

Esto coincide con nuestros datos, los que respondieron eran significativamente más jóvenes que aquellos con fracaso. Empleando el punto de corte en los 45 años, el tener esta edad o más estaría relacionado con una peor

respuesta. Todos nuestros pacientes que siguieron tratamiento y tenían menos de 45 años alcanzaron RVS.

La mayoría de nuestros pacientes tenían 45 años o más, tanto en el total de la muestra como en el grupo de pacientes tratados.

Con respecto al **sexo**, los datos son contradictorios. Algunos estudios han relacionado el sexo femenino con una mejor respuesta (108, 109, 154), mientras que en otros, no se ha corroborado la relación entre el sexo y la respuesta (155). Por el contrario, algunos autores han encontrado en el sexo masculino un factor predictivo de RVS (156-158). Recientemente, Villa, y cols. han encontrado tasas de RVS más bajas en mujeres con menopausia precoz (159) y Kogure, y cols. observaron una peor respuesta en mujeres de edad más avanzada (160).

En nuestro estudio, los hombres presentaron una peor respuesta, aunque las diferencias en el género rozan el nivel de significación ( $p=0,093$ ). Este hecho podría ser derivado de la falta de potencia estadística relacionada con el tamaño muestral.

De los **factores dependientes del virus**, la **carga viral** basal ha sido de los más estudiados. Los pacientes con cargas virales más altas presentan una menor tasa de RVS, constituyendo uno de los principales marcadores de pronóstico en la práctica clínica (107-111).

Esta asociación entre tener cargas virales elevadas ( $>400.000$  UI/ml.) y una peor respuesta se estableció también en nuestro caso ( $p=0,042$ ). La mayoría de nuestros pacientes presentaban cargas virales basales elevadas, tanto en aquellos que siguieron tratamiento, como en la totalidad de la muestra.

Con respecto al estudio genómico de la **región del Core**, a pesar de ser ésta una de las regiones más conservadas del virus, se ha observado variabilidad genómica con mutaciones en todos los casos tanto en los aminoácidos como en los nucleótidos, aunque con una prevalencia variable.

Se ha estudiado la región comprendida entre los aminoácidos 61-110, cuyas mutaciones han sido relacionadas con la respuesta al tratamiento por otros autores, pero además se han analizado otras dos regiones más cortas en los extremos, una entre los aminoácidos 45-60 y la otra entre los aminoácidos 111-125.

A pesar de que no se han encontrado publicaciones en lo relativo a **las regiones de los extremos**, en nuestro caso, aquella comprendida entre los aminoácidos 45-60 fue la más conservada, encontrando escasas mutaciones puntuales. En el otro extremo la expresión de valina en el aminoácido 119, y de histidina en el codón 114 estaba presente en casi todos los casos, consideradas como mutaciones al inicio del estudio, es probable, dada su prevalencia, que sean los aminoácidos basales en este genotipo.

Akuta, y cols. analizaron las secuencias de la región del Core **entre los aminoácidos 61-110** de 50 pacientes japoneses con hepatitis crónica por el genotipo 1b, encontrando 6 casos en los que no había ninguna mutación en esta región, el resto de los casos presentaban entre 1-4 mutaciones. Estas mutaciones estaban localizadas en los aminoácidos 70, 75, 83, 91, 94, 101, 106 y 110 (149).

También en población japonesa (68 pacientes), El-Shamy, y cols. analizaron una región más corta entre los aminoácidos 65-96, encontrando 15 casos sin mutaciones, y entre 1-3 mutaciones en el resto, con mutaciones en los aminoácidos 69-71, 75, 88, 91 y 94 (161).

En nuestro estudio, entre los aminoácidos 61-110, se ha observado una mayor tasa de mutación. Sólo se han encontrado dos casos sin mutaciones, y aunque la mayoría de los pacientes presentan entre 1-5 mutaciones, algunos casos tenían una mayor variabilidad. Encontrando mutaciones a lo largo de toda la secuencia excepto en el aminoácido 97.

Los distintos estudios encuentran una mayor tasa de mutación en los aminoácidos 70, 75 y 91, aunque con diferencias en cuanto a su frecuencia.

Los estudios en población japonesa presentan la mayor prevalencia de mutaciones en el aminoácido 75, encontrando en la sustitución de treonina por

alanina (**T75A**) la mutación más frecuente (149, 161, 162). También nosotros encontramos en la expresión de alanina la mutación más frecuente en este codón, sin embargo, hemos observado una mayor tasa de mutaciones en el aminoácido 91.

En cuanto a la prevalencia de mutaciones en los aminoácidos 91 y 70 hay más discrepancia. En población japonesa, algunos autores refieren más casos mutados en el codón 70 (161, 162), mientras que el grupo de Akuta observaron más mutaciones en el aminoácido 91 (149).

Acorde a estos últimos resultados, Alestig, y cols. analizaron únicamente las mutaciones en los aminoácidos 70 y 91 en 13 pacientes con infección por este genotipo en Suecia, observando más casos mutados en el codón 91. Además, analizaron un total de 2022 secuencias del genotipo 1b obtenidas del “Database Project”, constatando una mayor prevalencia de mutaciones en el aminoácido 91 (72%), y del 64% en el codón 70 (163). Esta prevalencia es algo superior a la observada en nuestro caso, con mutaciones en el 64,3% en el Core91 y en la mitad de los casos en el Core70.

A pesar de estas diferencias, en todos los estudios la sustitución de leucina por metionina en el aminoácido 91 (**L91M**), y de arginina por glutamina (**R70Q**) en el 70, son las detectadas con mayor frecuencia (149, 161-164). En nuestros pacientes, en el 55,7%, y 40%, respectivamente.

La relevancia de la variabilidad de esta región viene dada por su **implicación en la respuesta al tratamiento** combinado con peg-IFN y RBV. En 2005, Akuta, y cols. al analizar las mutaciones encontradas en la región del Core entre los aminoácidos 61-110 en el genotipo 1b, observaron una relación significativa entre las mutaciones en el aminoácido 70 y 91 con tasas más baja de RVS (149). Desde entonces, múltiples investigadores han buscado en la variabilidad de esta región un marcador de respuesta.

En nuestro estudio, para valorar las implicaciones de estas mutaciones como marcador pronóstico de respuesta a la biterapia con peg-IFN y RBV, se analizaron las secuencias de los 39 pacientes que finalizaron el tratamiento.

Con respecto al **aminoácido 70**, los resultados de Akuta, y cols. revelan que tanto la expresión de glutamina ( $p=0,004$ ), como la presencia de sustituciones, por glutamina o histidina ( $p=0,003$ ) estarían asociadas con una peor respuesta (149).

Por su parte, Hayashi, y cols. estudiaron 213 pacientes japoneses infectados por el genotipo 1b, observando que los pacientes con glutamina en este aminoácido respondían significativamente peor que aquellos que presentaban otros aminoácidos, arginina o histidina ( $p=0,0001$ ), (162).

En este sentido, otros estudios en población japonesa han encontrado asociación entre la variabilidad en el Core70 y la respuesta al tratamiento (156-158, 161, 164-171). En otras poblaciones, ha sido menos estudiado pero los trabajos de Alestig, y cols. en Suecia y de Donlin, y cols. en población americana corroboran estos resultados (163, 172).

Sin embargo, en un estudio español recientemente publicado no se han encontrado diferencias significativas en la respuesta al tratamiento, entre aquellos con glutamina en el Core70 y aquellos con arginina ( $p=0,157$ ), al analizar las secuencias de 33 pacientes con genotipo 1b (173).

En nuestros pacientes, la presencia de sustituciones, ya sea por glutamina o glicina en nuestro caso, se ha asociado con una peor respuesta ( $p=0,028$ ).

Los pacientes con glutamina respondieron peor que aquellos con arginina, pero rozando el nivel de significación ( $p=0,070$ ). Este hecho podría ser debido al pequeño tamaño muestral de nuestro estudio, sobre todo en el grupo de pacientes respondedores. Serían necesarios nuevos estudios con una mayor potencia estadística, que permitieran estimar con más fiabilidad si la expresión de glutamina en el codón 70 es predictor de la respuesta al tratamiento en nuestro medio.

La mayoría de estos estudios analizaron también las posibles implicaciones de las sustituciones en el **aminoácido 91** en la respuesta al tratamiento en pacientes con infección por el genotipo 1b, aunque con resultados contradictorios. Akuta, y cols. en su primer trabajo encontraron relación con una peor respuesta en aquellos con



metionina frente a aquellos con leucina ( $p=0,044$ ), (149). En este sentido, otros estudios posteriores, obtuvieron resultados parecidos (158, 164, 165, 167).

Hayes, y cols. analizando las sustituciones en este aminoácido en 399 pacientes con este genotipo observaron que la expresión de metionina se asociaba con la falta de respuesta en el análisis univariado ( $p=0,020$ ), mostrando cierta tendencia en el multivariado aunque sin alcanzar el nivel de significación ( $p=0,069$ ), (169).

Hayashi, y cols. analizando las secuencias de 213 pacientes encontraron en la presencia de leucina en el Core91 un factor asociado a la respuesta viral temprana, pero no con RVS ( $p=0,5643$ ), (162). En otro trabajo publicado por el mismo autor con 299 pacientes, tampoco observaron asociación significativa con RVS (166).

De manera similar, en los trabajos de Okanue, y cols. y El-Shamy, y cols. la variabilidad en este aminoácido tampoco aparecía relacionada con la respuesta (156, 161, 170).

Con todo ello, los resultados en población japonesa no son concluyentes. En otras poblaciones, no parece que las sustituciones en el aminoácido 91 estén implicadas en la respuesta al tratamiento, ni los trabajos de Alestig, y cols. en Suecia, ni de Donlin, y cols. en población americana han establecido relación con RVS (163, 172).

En nuestro caso, además de metionina también se ha detectado histidina en el Core91. Ni la expresión de metionina ( $p=0,285$ ) ni la presencia de sustituciones (metionina/histidina), ( $p=0,277$ ) se relacionaron con la respuesta, al igual que en los otros estudios en población caucásica.

Las mutaciones en el **aminoácido 75** han sido analizadas en los trabajos de Akuta, y cols. y de Hayashi, y cols. sin que observaran relación con la respuesta (149, 162). Nuestros resultados, concuerdan con estos estudios, ya que no se han encontrado diferencias significativas, ni con la presencia de alanina ( $p=0,448$ ), mutación más frecuente; ni con la presencia de cualquiera de las mutaciones encontradas en su conjunto ( $p=0,471$ ). Por eso, a pesar de su frecuencia, no parece

que las mutaciones en este aminoácido estén implicadas en el escape del virus a los efectos del interferón.

Akuta, y cols. observaron que la expresión de asparagina en vez de treonina en el **aminoácido 110** aparecía con más frecuencia en el grupo de no-respondedores ( $p=0,082$ ), (149). En este sentido, en el estudio español recientemente publicado, Di Lello, y cols. encontraron que la presencia de asparagina en este aminoácido está relacionada con tasas más bajas de RVS en pacientes caucásicos ( $p=0,004$ ), (173).

En nuestro caso, aunque no hemos encontrado significación estadística, llama la atención la presencia de mutaciones únicamente entre aquellos que no alcanzaron RVS, incluídos los 3 pacientes en los que se detectó asparagina.

Serían precisos nuevos estudios que validen estos resultados y establezcan con mayor fiabilidad el impacto de las mutaciones en este aminoácido.

Di Lello, y cols. estudiaron además, las mutaciones en el **aminoácido 62** en sus 33 pacientes con genotipo 1b, el 70% de aquellos que presentaban glicina alcanzaron RVS, frente al 39% de aquellos con arginina, aunque estas diferencias no fueron significativas ( $p=0,141$ ), (173). En nuestro trabajo sólo se ha detectado glicina en el Core62 en un único paciente que no alcanzó RVS, sin que se observaran otros casos con mutaciones.

En nuestro caso, se valoraron el resto de las mutaciones encontradas en la región comprendida entre los aminoácidos 61-110, sin que se haya encontrado asociación con la respuesta en ninguna de ellas.

Parece fundamentado que la variabilidad en el aminoácido 70 de la región del Core se correlaciona con la respuesta al tratamiento combinado con peg-IFN y RBV, lo que permitiría predecir la probabilidad de alcanzar RVS. El papel de la variabilidad en otros codones, sobre todo en 91 y 110, no está claro, se necesitarían nuevos estudios que precisen su implicación en la respuesta.

En otras terapias, recientes estudios han encontrado implicación de las mutaciones en el Core70 en pacientes japoneses en triple terapia con peg-IFN, RBV y telaprevir (174, 175).

No se conocen los **mecanismos** por los que las mutaciones presentes en la región del Core puedan favorecer la resistencia a la acción antiviral del interferón. Podrían estar en relación con la interacción en la cascada de señales Jak-STAT que induciría el IFN al interactuar en la célula, y por tanto en la transducción de los genes inducidos que inhibirían la replicación viral. Este proceso pudiera estar relacionado con la interleucina-6 que inhibiría la cascada de señales a través de la sobreexpresión de un inhibidor de la señalización (SOCS3), (176-178).

Nuestro estudio de la **región NS5A**, incluía las secuencias entre los aminoácidos 2200 y 2260, observándose heterogeneidad genómica con mutaciones tanto en los aminoácidos como en los nucleótidos, aunque con una prevalencia variable.

La región ISDR, cuyas mutaciones se han asociado con la respuesta al tratamiento está comprendida entre los aminoácidos 2209 y 2248, lo que deja al igual que ocurrió en la región del Core, otras dos secuencias más cortas en los extremos: una entre los aminoácidos 2200-2208 y la otra entre los aminoácidos 2249-2260.

En cuanto a los extremos, no se han encontrado publicaciones respecto a la región comprendida **entre los aminoácidos 2200-2208**, en nuestro caso, la mayoría de las secuencias estaban conservadas.

Dos estudios publican las secuencias entre los aminoácidos 2209 y 2270, con los que han podido valorar los resultados obtenidos entre los aminoácidos **2249-2260**, región secuenciada en nuestro caso.

Tanto en el trabajo de Muñoz de Rueda, y cols. (179) que analizaron las secuencias de 60 pacientes con infección por genotipo 1 en España, 47 de ellos debidos al subtipo b; como en el de Yen, y cols. (180) en China con 60 pacientes con

genotipo 1b, hay que destacar la expresión en casi todos los casos de isoleucina en el codón 2252, al igual que en nuestro estudio, aunque en nuestro caso fue considerada como mutación.

De manera parecida, en ambos estudios y en nuestro caso, hay una expresión mayoritaria de valina en 2251 y de leucina en 2259, aunque la primera considerada como mutación por el grupo de Yen, y la segunda por el grupo de Muñoz de Rueda.

En nuestro trabajo y en el estudio español, en casi todos los casos aparece aspartato en el codón 2257, también considerado como mutación en nuestro caso. Yen, y cols., también encuentran un predominio de aspartato; sin embargo, detectaron glutámico en el 21,6% de los casos, aminoácido recogido en nuestra secuencia de referencia.

En la **región ISDR**, en nuestro estudio, es en el **codón 2218** donde se ha observado la mayor tasa de mutaciones, con la sustitución de histidina por arginina (**H2218R**) como la más frecuente. Todo ello concuerda con los datos publicados en España, por Sáiz, y cols. en Barcelona y por el grupo de Muñoz de Rueda en Granada (179, 181); y con los resultados de Squadrito, y cols. al analizar las secuencias de 48 pacientes con infección por el genotipo 1b (21 de Francia y 27 de Italia), (182). Al igual que lo descrito en población japonesa por Enomoto, y cols. (152) y por el grupo de Yen en China (180).

La **asociación** entre **el número de mutaciones en la región ISDR** (2209-2248 aminoácidos) de la región NS5A, y la **respuesta al tratamiento** ya fue descrita por Enomoto, y cols. en 1996. Clasificaba el virus según el número de mutaciones encontradas en esta región en tres grupos diferentes: Variante salvaje, sin mutaciones; variante intermedia, entre 1 y 3 mutaciones; y, variante mutante, con cuatro o más mutaciones. De modo que todos los casos con la variante mutante alcanzaron RVS al ser tratados en monoterapia con interferón estándar, mientras que ninguno de los que presentaban la variante salvaje alcanzó RVS (152).

En nuestro caso para analizar las implicaciones de la variabilidad genómica de esta región ISDR con la respuesta al tratamiento, se estudiaron las secuencias de los 39 pacientes finalizaron tratamiento.

En ellos, el 75% de los que no presentaban mutaciones no respondieron al tratamiento.; observándose el mismo comportamiento en aquellos que presentaban una única mutación (el 75% no respondió). Por ello, se consideró como **variante salvaje**, a aquellos sin mutaciones o con 1 única mutación; y, **variante mutante**, si presentaban 2 o más mutaciones. La variante salvaje, así establecida, que es la asociada con una peor respuesta, fue lo más frecuente, tanto en el total de la muestra (65,7%), como en aquellos que recibieron tratamiento (71,8%).

Distintos autores han analizado las mutaciones en esta región considerando la variante salvaje y mutante del virus con las mismas definiciones que en nuestro caso, observando un predominio de la variante salvaje, igual que ocurre en nuestros pacientes.

Así, Hayashi, y cols. en dos estudios en los que estudiaron las secuencias de 299 y 213 pacientes japoneses con infección por el VHC genotipo 1b, encontraron que el 76,25% y el 77,46% de ellos, respectivamente, estaban infectados por un virus con la variante salvaje en la región ISDR (162, 166). Y con una prevalencia algo mayor, Kurosaki, y cols. en un estudio multicéntrico retrospectivo en Japón, también encuentran un predominio de la variante salvaje, que estaría presente en el 88% de los 496 casos analizados (168).

Enomoto, y cols. analizaron la relación entre la heterogeneidad genómica en la región ISDR con la respuesta al tratamiento con IFN estándar, encontrando una fuerte asociación con RVS en aquellos que presentaban la variante mutante del virus, definida en este caso, con la presencia de 4 o más mutaciones, frente a aquellos sin mutaciones ( $p<0,001$ ) y a aquellos con la variante intermedia (1-3 mutaciones), ( $p<0,001$ ), (152).

Estudios posteriores en Japón aportaron consistencia a estos datos, al observar igualmente asociación entre aquellos con la variante mutante y la RVS (183, 184).

Sin embargo, los estudios realizados en Europa y América presentan resultados contradictorios. Mientras algunos autores como Sáiz, y cols. en España, que analizando las secuencias de 36 pacientes con infección crónica por el genotipo 1b que fueron tratados con IFN- $\alpha$  2b, encontraron que aquellos con la variante mutante del virus respondían mejor que aquellos con la variante intermedia ( $p=0,009$ ) y que aquellos con la variante salvaje ( $p<0,001$ ), (181). Otros, como Squadrito, y cols. con secuencias de pacientes de Francia e Italia, y Chung, y cols. que analizaron retrospectivamente el suero de 22 pacientes infectados con genotipo 1b antes del tratamiento en EE.UU., no validaron estos resultados (182, 185).

En 2004, Pascu, y cols. publicaron un meta-análisis en el que estudiaban 1.230 secuencias de pacientes con infección por VHC-1b tratados con IFN en monoterapia o en combinación con RBV (655 de paciente japoneses y 525 de pacientes europeos). Analizaron las mutaciones en la región ISDR, según se tratara de la variante salvaje, variante intermedia y mutante. Observando una correlación positiva entre la tasa de RVS y la variante de ISDR tanto en población japonesa como en pacientes europeos (186).

Aunque se había especulado que las discrepancias entre los resultados de los estudios japoneses y europeos podrían ser debidas a una menor presencia de la variante mutante en la población europea, este meta-análisis constató que la variante mutante estaría igualmente representada en ambas áreas geográficas.

El **mecanismo** por el cual la variabilidad genómica de esta región influiría en la sensibilidad al IFN no está claro, aunque parece que la región ISDR interactuaría con la proteínacina (PKR) que regula la replicación viral (187). Por otro lado, se ha demostrado *in vitro* que el NS5A induciría la expresión de interleucina-8 (IL-8), que actuaría inhibiendo la cascada de señalización que induce el IFN. La heterogeneidad en esta región también podría tener algún papel también a este nivel (188, 189).

Con la **terapia combinada con peg-IFN y RBV** numerosos autores siguen indicando el valor pronóstico de la variabilidad genómica de esta región ISDR. La mayoría de los estudios publicados, sobre todo en población japonesa, encuentran asociación entre el número de mutaciones en la región ISDR y la tasa de RVS, a pesar de que han empleado distintos parámetros para definir las variantes.

En este sentido, Shirakawa, y cols. encontraron asociación con RVS catalogando las 120 secuencias que analizó en las tres variantes descritas por Enomoto, y cols. (190). Hayashi, y cols. y Okanoue, y cols. encontraron en la presencia de 2 o más mutaciones en la región ISDR un buen marcador de RVS (156, 162, 166). El-Shamy, y cols. analizaron las secuencias de 57 pacientes sin observar correlación significativa con RVS con la presencia de 2 o más mutaciones, lo que consideraron en relación con una menor prevalencia de la variante mutante así entendida. Sin embargo, esta asociación con RVS se establecía con el presentar alguna mutación frente a aquellos que no presentaban ninguna (170).

En China, los resultados de Yen, y cols. que analizaron las secuencias de 60 pacientes con genotipo 1b, indican asociación con RVS en aquellos que presentaban 4 o más mutaciones (180).

Muñoz de Rueda, y cols. refieren un 68% de RVS entre aquellos con mutaciones frente al 45% de aquellos sin mutaciones, sin alcanzar el nivel de significación pero próximo a él ( $p=0,07$ ), en los 47 pacientes con genotipo 1b (179).

Otros autores tampoco han podido establecer esta relación entre la región ISDR y la RVS. En Italia, Capiello, y cols. estudiaron las secuencias de 45 pacientes con infección por genotipo 1b, 23 de ellos siguieron tratamiento con peg-IFN y RBV, y 22 con IFN- $\alpha$ 2b y RBV, sin encontrar diferencias significativas entre las tres variantes del virus (salvaje/intermedia/mutante) y la respuesta al tratamiento, independientemente de la formulación del IFN (191).

En nuestro caso, no se halló asociación entre la variabilidad de la región ISDR y la respuesta al tratamiento, aunque se observó un mayor fracaso en aquellos con la variante salvaje (75% de los casos vs. 63,6% de aquellos con la variante mutante), ( $p=0,694$ ).

Se planteó la posibilidad de que la variabilidad en la región del Core podría explicar estos resultados, por lo que se analizaron de manera conjunta ambas variables. Para ello se eligió la presencia o no de sustituciones en el aminoácido 70 del Core, al ser el único en el que se constató relación con fracaso al tratamiento en nuestro caso.

En este sentido, la falta de respuesta en aquellos que presentaban dos o más mutaciones en el ISDR podría ser debida a la presencia de sustituciones en el Core70 (el 85,7% de ellos presentaban mutaciones). Pero además, la variante salvaje del ISDR, podría justificar la falta de respuesta en aquellos que no presentaban mutaciones en el aminoácido 70 del Core (presente en el 91,7% de ellos).

Al analizar **conjuntamente ambas regiones**, se observó que el 75% de aquellos con ambas regiones favorables alcanzaron RVS, mientras que en el otro extremo, el 90,9% de aquellos con ambas regiones desfavorables no respondieron. Cuando sólo una de las dos regiones es desfavorable, también fue mayor el porcentaje de pacientes que fracasaron al tratamiento: el 85,7% de aquellos con mutaciones en el Core70 a pesar de tener la variante mutante; y, el 64,7% de aquellos con la variante salvaje pero sin mutaciones en el Core70.

El análisis estratificado, mostró que en ausencia de mutaciones en el Core70, los que tenían la variante salvaje del virus respondían peor pero sin significación estadística ( $p=0,177$ ).

Por otro lado, el tener ambas regiones desfavorables (sustituciones en el Core70 y ninguna ó 1 mutación en el ISDR) estaba asociado con la falta de RVS ( $p=0,029$ ). Y, ante la variante mutante de la región ISDR, la presencia de sustituciones en el Core70 mostraba una mayor probabilidad de fracaso, rozando el nivel de significación ( $p=0,068$ ).

Además, se observó una mayor correlación, si se tenían en cuenta ambas regiones: el 42,9% de aquellos con arginina en el Core70 respondió favorablemente, pero, si además presentan la variante mutante, el 75% alcanzó RVS; mientras que, el 88,9% de aquellos que presentan sustituciones en el aminoácido 70 de la región del



Core no respondieron, pero, si además presentan la variante salvaje del ISDR, no respondieron el 90,9%. Parece que el estudio de la región ISDR podría mejorar la capacidad de predicción de la región del Core en nuestros pacientes.

Hayashi, y cols. también analizaron ambas regiones, observando resultados parecidos a los nuestros. En 213 pacientes con infección crónica por genotipo 1b, advirtieron RVS en el 55,4% de aquellos sin glutamina en el Core70 mientras que el 76,5% alcanzó RVS cuando presentaban simultáneamente los dos factores favorables (no glutamina en el Core70 y 2 o más mutaciones en la región ISDR); postulando, por tanto, al igual que nosotros, que el estudio conjunto de ambas regiones mejoraría la fiabilidad pronóstica (162).

Se analizó, por tanto, la contribución en la predicción de fracaso si se estudian conjuntamente ambas regiones, para lo que se creó un modelo de regresión logística, observando que el área bajo la curva estimada teniendo en cuenta la presencia de sustituciones en el Core70 es de 0,695 (IC95%: 0,51-0,87;  $p=0,061$ ); y aumenta si además se tiene en cuenta el número de mutaciones de la región ISDR (ABC: 0,745, IC95%: 0,87-0,92;  $p=0,018$ ). Este incremento se ha estimado en el 7%, aunque no representa significación estadística ( $p=0,1982$ ). Sin embargo, la contribución real de la región ISDR no se ha podido establecer, en relación con la potencia estadística debida al tamaño muestral.

El estudio de las mutaciones en el aminoácido 70 del Core permitiría predecir la respuesta al tratamiento. Si se analiza de manera conjunta la variabilidad de la región ISDR parece que aportaría una mayor fiabilidad.

Aún así, no se puede estimar con seguridad cuál sería la respuesta al tratamiento ante un paciente determinado, ya que no todos los pacientes con ambas regiones favorables alcanzaron RVS, y no todos pacientes con las dos regiones desfavorables fueron pacientes con fracaso.

Otros factores relacionados con la respuesta, tales como, la variabilidad en otras regiones del virus (región codificante de la proteína NS3 o de las glicoproteínas de la envuelta E1 y E2), la presencia de cuasiespecies e incluso factores de dependientes del huésped, podrían explicar estos casos.

El análisis de estos otros factores relacionados con la respuesta junto con las dos regiones estudiadas por nosotros, mejorarían los modelos predictivos aportando, además, validez a nuestros resultados, ya que podrían interferir en ellos.

En este sentido, varios estudios han valorado diversos de estos factores de manera conjunta. Entre ellos, Kurosaki, y cols. han desarrollado un modelo de árbol de decisión basado en el estudio conjunto de la región del Core (presencia o no de mutaciones en el aminoácido 70), y la variante salvaje (0-1 mutaciones) o mutante (2 o más mutaciones) de la región ISDR, pero incluyendo además otros marcadores de respuesta: edad, niveles de colesterol-LDL y grado de fibrosis. Sus resultados muestran que el análisis conjunto de todos ellos, permitiría predecir con alta probabilidad la RVS (192).

Los nuevos agentes antivirales abren las expectativas de curación en los pacientes con hepatopatía por el VHC genotipo 1b. A pesar de ello, estos resultados pueden ser de utilidad cuando se empleen terapias con moléculas cuyo mecanismo de acción implique alguna de las regiones estudiadas.

## VI.Conclusiones

1. En nuestros pacientes con infección crónica por VHC genotipo 1b, las regiones estudiadas, tanto del Core como NS5A muestran una gran variabilidad genética.
2. Con respecto a la prevalencia, en nuestro estudio, los codones con mayor tasa de mutación en la región del Core son 91, 75 y 70, siendo las mutaciones L91M, T75A y R70Q las encontradas con mayor frecuencia.
3. En la región ISDR hemos observado una mayor tasa de mutaciones en el codón 2218, con la expresión de arginina (H2218R). En cuanto al número de mutaciones en esta región, nuestros pacientes presentan un predominio de la variante salvaje del virus.
4. En lo relativo al impacto en la respuesta al tratamiento con peg-IFN y RBV, de los factores dependientes del huésped, en nuestros pacientes, el tener 45 años o más supone un mayor riesgo de fracaso al tratamiento.
5. De los factores dependientes del virus, la carga viral basal elevada (>400.000 UI/ml) se ha asociado con una peor respuesta.
6. En nuestro estudio, el análisis de las mutaciones en el aminoácido 70 de la región del Core ayuda a predecir la respuesta al tratamiento. Significativamente, los pacientes con sustituciones en este aminoácido respondieron peor que aquellos sin mutaciones.
7. Con nuestros datos, la variabilidad genómica de la región ISDR, por sí sola, no ha demostrado tener utilidad como marcador de respuesta.

8. En nuestro caso, el estudio conjunto de ambas regiones parece que permitiría predecir mejor la probabilidad de respuesta a la biterapia con peg-IFN y RBV que si sólo se consideraran las sustituciones en el aminoácido 70 de la región del Core.
9. Por último, en relación al importante avance en el tratamiento de la hepatitis C, que se ha producido últimamente, el análisis de estas regiones, podría seguir teniendo interés, sobre todo en las terapias que empleen moléculas cuyo mecanismo de acción afecte a las regiones estudiadas.

## VII.Bibliografía

1. Blumberg BS, Alter, HJ, Visnich S. A "New" antigen in leukemia sera. JAMA. 1965;191:541-6.
2. Blumberg BS, Sutnick, AJ, London WT. Australia antigen and hepatitis. JAMA. 1969;207(10):1895-6.
3. Prince AM. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. Proc Natl Acad Sci USA. 1968;60(3):814-21.
4. Del Prete S, Doglia M, Ajdukiewicz A, Fox RA, Constantino D, et al. Detection of a new serum-antigen in three epidemics of short-incubation hepatitis. Lancet. 1970;2(7673):579-81.
5. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purceli RH. Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. Science. 1973;182(4116):1026-8.
6. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overbry LR, Bradley DW, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science. 1989;244(4902):359-62.
7. Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, et al. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. Arch Virol. 1998;143(12):2493-503.
8. Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, et al. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. J Gen Virol. 1994;75(Pt 7):1755-60.
9. Louis E. Three-dimensional model of HCV. The PRN Notebook Online. Disponible en: [www.prn.org](http://www.prn.org)
10. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci USA. 1991;88(6):2451-5.
11. Ashfaq UA, Khan SN, Nawaz Z, Riazuddin S. In-vitro model systems to study Hepatitis C Virus. Genet Vaccines Ther. 2011;9:7.
12. Goutagny N, Fatmi A, De Ledinghen V, Penin F, Couzigou P, et al. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. J Infect Dis. 2003;187(12):1951-8.

13. Sung VM, Shimodaira S, Doughty AL, Picchio GR, Can H, et al. Establishment of B-cell lymphoma cell lines persistently infected with hepatitis C virus in vivo and in vitro: the apoptotic effects of virus infection. *J Virol*. 2003;77(3):2134-46.
14. Llanes MS, Palacios NS, Piccione M, Ruiz MG, Layana C. Molecular aspects of the antiviral response against hepatitis C virus implicated in vaccines development. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33(4):273-80.
15. Sanz-Carmeno P, Borque MJ, García-Buey L, Moreno-Otero R. Interaction of the hepatitis C virus with the cellular membrane. *Gastroenterol Hepatol*. 2002;25(8):521-5.
16. Micheloud D. Virus de la Hepatitis C. *Epidemiologia Molecular de Enfermedades Infecciosas*. Disponible en: <http://epidemiologiamolecular.com/virus-hepatitis-vhc>
17. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*. 2004;39(1):5-19.
18. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol*. 1993;74(Pt 11):2391-9.
19. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005;42(4):962-73.
20. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus-15 years on. *J Gen Virol*. 2004;85(Pt 11):3173-88.
21. Schröter M, Feucht HH, Zöllner B, Schäfer P, Laufs R. Multiple infections with different HCV genotypes: prevalence and clinical impact. *J Clin Virol*. 2003;27(2):200-4.
22. Kalinina O, Norder H, Mukomolov S, Magnus LO. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *J Virol*. 2002;76(8):4034-43.
23. González-Candelas F, López-Labrador FX, Bracho MA. Recombination in hepatitis C Virus. *Viruses*. 2011;3(10):2006-24.
24. Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int*. 2009;29 Suppl 1:74-81.



25. WHO. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection. Geneva: World Health Organization; 2014. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK263483/>
26. Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus. *J Hepatol*. 2014;61(1 Suppl):S45-57.
27. Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*. 2013;57(4):1333-42.
28. Hussain Z. Genomic heterogeneity of hepatitis viruses (A-E): role in clinical implications and treatment. En: Serviddio G (Eds.) *Practical management of chronic viral hepatitis*; 2013. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/practical-management-of-chronic-viral-hepatitis/genomic-heterogeneity-of-hepatitis-viruses-a-e-role-in-clinical-implications-and-treatment>
29. Esteban JI, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol*. 2008;48(1):148-62.
30. Servicio de Vigilancia Epidemiológica. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Comentario epidemiológico de las Enfermedades de Declaración Obligatoria y Sistema de Información Microbiológica. España. Año 2013. *Boletín Epidemiológico Semanal*. 2014;22(13):167-84.
31. Bruguera M, Forns X. Hepatitis C in Spain. *Med Clin (Barc)*. 2006;127(3):113-7.
32. Bruggmann P, Berg T, Øvrehus AL, Moreno C, Brandão Mello CE, et al. Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in selected countries. *J Viral Hepat*. 2014;21 Suppl 1:5-33.
33. Pérez Mota A, Blanco Coronado MA, Graus Morales J, Rodero Vázquez de Castro R, Pérez Muñoz C, et al. Chronic hepatitis C. Epidemiology and therapeutic results in 255 cases. *An Med Interna*. 2006;23(6):257-9.
34. Sharma NK, Sherker AH. Epidemiology, risk factors, and natural history of chronic hepatitis C. En: Shetty K, Wu Y, (Eds.) *Clinical Gastroenterology: Chronic Viral Hepatitis*; 2010.

35. Alter MJ. Epidemiology of Hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2007;13(17):2436-41.
36. Pérez-Álvarez R, García-Samaniego J, Solá R, Pérez-López R, Bárcena R, et al. Acute hepatitis C in Spain: a retrospective study of 131 cases. *Rev Esp Enferm Dig*. 2012;104(1):21-8.
37. Karmochkine M, Carrat F, Dos Santos O, Cacoub P, Raguin G. A case-control study of risk factors for hepatitis C infection in patients with unexplained routes of infection. *J Viral Hepat*. 2006;13(11):775-82.
38. Martínez-Bauer E, Forns X, Armelles M, Planas R, Solá R, et al. Hospital admission is a relevant source of hepatitis C virus acquisition in Spain. *J Hepatol*. 2008;48(1):20-7.
39. Nelson PK, Mathers BM, Cowie B, Hagan H, Des Jarlais D, et al. Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs: results of systematic reviews. *Lancet*. 2011;378(9791):571-83.
40. Serrano-Villar S, Sobrino-Vegas P, Monge S, Dronda F, Hernando A, et al; CoRIS. Decreasing prevalence of HCV coinfection in all risk groups for HIV infection between 2004 and 2011 in Spain. *J Viral Hepat*. 2015;22(5):496-503.
41. Terrault NA, Dodge JL, Murphy EL, Tavis JE, Kiss A, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among monogamous heterosexual couples: the HCV partners study. *Hepatology*. 2013;57(3):881-9.
42. Urbanus AT, Van De Laar TJ, Geskus R, Vanhommerig JW, Van Rooijen MS, et al. Trends in hepatitis C virus infections among MSM attending a sexually transmitted infection clinic; 1995-2010. *AIDS*. 2014;28(5):781-90.
43. Mast EE, Hwang LY, Seto DS, Nolte FS, Nainan OV, et al. Risk factors for perinatal transmission of hepatitis C virus (HCV) and the natural history of HCV infection acquired in infancy. *J Infect Dis*. 2005;192(11):1880-9.
44. Roberts EA, Yeung L. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2002;36(5 Suppl 1):S106-13.
45. Ruiz-Extremuera A, Muñoz-Gámez JA, Salmerón-Ruiz MA, de Rueda PM, Quiles-Pérez R, et al. Genetic variation in interleukin 28B with respect to vertical

- transmission of hepatitis C virus and spontaneous clearance in HCV-infected children. *Hepatology*. 2011;53(6):1830-8.
46. Jafari S, Copes R, Baharlou S, Etminan M, Buxton J. Tattooing and the risk of transmission of hepatitis C: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis*. 2010;14(11):e928-40.
  47. Hwang LY, Kramer JR, Troisi C, Bull L, Grimes CZ, et al. Relationship of cosmetic procedures and drug use to hepatitis C and hepatitis B virus infections in a low-risk population. *Hepatology*. 2006;44(2):341-51.
  48. Scheinmann R, Hagan H, Lelutiu-Weinberger C, Stern R, Des Jarlais DC, et al. Non-injection drug use and hepatitis C virus: a systematic review. *Drug Alcohol Depend*. 2007;89(1):1-12.
  49. Thomson EC, Fleming VM, Main J, Klenerman P, Weber J, et al. Predicting spontaneous clearance of acute hepatitis C virus in a large cohort of HIV-1-infected men. *Gut*. 2011;60(6):837-45.
  50. Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, Gruener NH, Jung MC, et al. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology*. 2003;125(1):80-8.
  51. Farci P, Shimoda A, Coiana A, Díaz G, Peddis G, et al. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science*. 2000;288(5464):339-44.
  52. Chen S, Wang Y. Multigene tracking of quasispecies in viral persistence and clearance of hepatitis C virus. *World J Gastroenterol*. 2005;11(19):2874-84.
  53. Tillmann HL, Thompson AJ, Patel K, Wiese M, Tenckhoff H, et al. A polymorphism near IL28B is associated with spontaneous clearance of acute hepatitis C virus and jaundice. *Gastroenterology*. 2010;139(5):1586-92.
  54. Grebely J, Page K, Sacks-Davis R, van der Loeff MS, Rice TM, et al. The effects of female sex, viral genotype, and IL28B genotype on spontaneous clearance of acute hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2014;59(1):109-20.
  55. Alric L, Fort M, Izopet J, Vinel JP, Charlet JP, et al. Genes of the major histocompatibility complex class II influence the outcome of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 1997;113(5):1675-81.

56. Thursz M, Yallop R, Goldin R, Trepo C, Thomas HC. Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. The HENCORE group. Hepatitis C European Network for Cooperative Research. *Lancet*. 1999;354(9196):2119-24.
57. Kaplan M, Gawrieh S, Cotler SJ and Jensen DM. Neutralizing antibodies in hepatitis C virus infection: a review of immunological and clinical characteristics. *Gastroenterology*. 2003;125(2):597-604.
58. Alberle JH, Formann E, Steindl-Munda P, Weseslindtner L, Gurguta C, et al. Prospective study of viral clearance and CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C primary infection and reinfection. *J Clin Virol*. 2006;36(1):24-31.
59. Semmo N, Klenerman P. CD4+ T cell responses in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2007;13(36):4831-8.
60. Fernández Rodríguez CM, Gutierrez García ML. Impact of antiviral therapy on the natural history of hepatitis C virus. *Gastroenterol Hepatol*. 2014;37(10):583-92.
61. Cacoub P, Renou C, Rosenthal E, Cohen P, Louri I, et al. Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection. A prospective multicenter study of 321 patients. The GERMIVIC. Groupe d'Etude et de Recherche en Medecine Interne et Maladies Infectieuses sur le Virus de l'Hepatitis C. *Medicine (Baltimore)*. 2000;79(1):47-56.
62. Jacobson IM, Cacoub P, Dal Maso L, Harrison SA, Younossi ZM. Manifestations of chronic hepatitis C virus infection beyond the liver. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010;8(12):1017-29.
63. National Institutes of Health. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of Hepatitis C: 2002-June 10-12, 2002). *Hepatology*. 2002;36(5 Suppl 1):S3-20.
64. Thein HH, Yi Q, Dore GJ and Krahn MD. Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression. *Hepatology*. 2008;48(2):418-31.

65. Raimondi S, Bruno S, Mondelli MU, Maisonneuve P. Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis. *J Hepatology*. 2009;50(6):1142-54.
66. Bochud PY, Cai T, Overbeck K, Bochud M, Dufour JF, et al. Genotype 3 is associated with accelerated fibrosis progression in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2009;51(4):655-66.
67. Marabita F, Aghemo A, De Nicola S, Rumi MG, Cheroni C, et al. Genetic variation in the interleukin-28B gene is not associated with fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C and known date of infection. *Hepatology*. 2011;54(4):1127-34.
68. Squadrito G, Cacciola I, Alibrandi A, Pollicino T, Raimondo G. Impact of occult hepatitis B virus infection on the outcome of chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2013;59(4):696-700.
69. Pineda JA, Romero-Gómez M, Díaz-García F, Girón-González JA, Montero JL, et al. HIV coinfection shortens the survival of patients with hepatitis C virus-related decompensated cirrhosis. *Hepatology*. 2005;41(4):779-89.
70. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet*. 1997;349(9055):825-32.
71. Minola E, Prati D, Suter F, Maggiolo F, Caprioli F, et al. Age at infection affects the long-term outcome of transfusion-associated chronic hepatitis C. *Blood*. 2002;99(12):4588-91.
72. Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, et al. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2000;31(4):828-33.
73. Bochud PY, Bibert S, Kutalik Z, Patin E, Guergnon J, et al. IL28B alleles associated with poor hepatitis C virus (HCV) clearance protect against inflammation and fibrosis in patients infected with non-1 HCV genotypes. *Hepatology*. 2012;55(2):384-94.

74. Rauch A, Kotalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology*. 2010;138(4):1338-45.
75. Patin E, Kotalik Z, Guernon J, Bibert S, Nalpas B, et al. Genome-wide association study identifies variants associated with progression of liver fibrosis from HCV infection. *Gastroenterology*. 2012;143(5):1244-52.
76. Wiese M, Fischer J, Löbermann M, Göbel U, Grüngreiff K, et al. Evaluation of liver disease progression in the German hepatitis C virus (1b)-contaminated anti-D cohort at 35 years after infection. *Hepatology*. 2014;59(1):49-57.
77. Everhart JE, Lok AS, Kim HY, Morgan TR, Lindsay KL, et al. Weight-related effects on disease progression in the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial. *Gastroenterology*. 2009;137(2):549-57.
78. Lambrecht RW, Sterling RK, Naishadham D, Stoddard AM, Rogers T, et al. Iron levels in hepatocytes and portal tract cells predict progression and outcomes of patients with advanced chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2011;140(5):1490-500.
79. Pessione F, Degos F, Marcellin P, Duchatelle V, Njapoum C, et al. Effect of alcohol consumption on serum hepatitis C virus RNA and histological lesions in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 1998;27(6):1717-22.
80. Ostapowicz G, Watson KJ, Locarnini SA, Desmond PV. Role of alcohol in the progression of liver disease caused by hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 1998;27(6):1730-5.
81. Wiley TE, McCarthy M, Breidi L, McCarthy M, Layden TJ. Impact of alcohol on the histological and clinical progression of hepatitis C infection. *Hepatology*. 1998;28(3):805-9.
82. Serfaty L, Poujol-Robert A, Carbonell N, Chazouillères O, Poupon RE, et al. Effect of the interaction between steatosis and alcohol intake on liver fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(7):1807-12.
83. Dev A, Patel K, Conrad A, Blatt LM and McHutchison JG. Relationship of smoking and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4(6):797-801.

84. Pessione F, Ramond MJ, Njapoum C, Duchatelle V, Degott C, et al. Cigarette smoking and hepatic lesions in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2001;34(1):121-5.
85. Ishida JH, Peters M, Jin C, Louie K, Tan V, et al. Influence of cannabis use on severity of hepatitis C disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008;6(1):69-75.
86. Hèzode C, Zafrani ES, Roudot-Thoraval F, Costentin C, Hessami A, et al. Daily cannabis use: a novel risk factor of steatosis severity in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2008;134(2):432-9.
87. Modi AA, Feld JJ, Park Y, Kleiner DE, Everhart JE, et al. Increased caffeine consumption is asociated with reduced hepatic fibrosis. *Hepatology*. 2010;51(1):201-9.
88. Freedman ND, Everhart JE, Lindsay KL, Ghany MG, Curto TM, et al. Coffe intake is associated with lower rates of liver disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2009;50(5):1360-9.
89. Hu KQ, Tong MJ. The long-term outcomes of patients with compensated hepatitis C virus-related cirrhosis and history of parenteral exposure in the United States. *Hepatology*. 1999;29(4):1311-6.
90. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2557-76.
91. Aguilera Guirao A, Alonso Fernández R, Córdoba Cortijo J, Fuertes Ortiz de Urbina A. Diagnóstico microbiológico de las hepatitis víricas. Procedimientos en Microbiología Clínica. En: Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R, (Eds.) Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 2014.
92. Colin C, Lanoir D, Touzet S, Meyaud-Kraemer L, Bailly F, et al. Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *J Viral Hepat*. 2001;8(2):87-95.
93. Stockman LJ, Guilfoye SM, Benoit AL, Vergeront JM, Davis JP. Rapid hepatitis C testing among persons at increased risk for infection-Wisconsin, 2012-2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2014;63(14):309-11.

94. Medici MC, Furlini G, Rodella A, Fuertes A, Monachetti A, et al. Hepatitis C virus core antigen: analytical performances, correlation with viremia and potential applications of a quantitative, automated immunoassay. *J Clin Virol*. 2011;51(4):264-9.
95. Moscato GA, Giannelli G, Grandi B, Pieri D, Marsi O, et al. Quantitative determination of hepatitis C core antigen in therapy monitoring for chronic hepatitis C. *Intervirology*. 2011;54(2):61-5.
96. Radkowski M, Gallegos-Orozco JF, Jablonska J, Colby TV, Walewska-Zielecka B, et al. Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2005;41(1):106-14.
97. Swain MG, Lai MY, Shiffman ML, Cooksley WG, Zeuzem S, et al. A sustained virologic response is durable in patients with chronic hepatitis C treated with peginterferon alfa-2a and ribavirin. *Gastroenterology*. 2010;139(5):1593-601.
98. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*. 2001;358(9286):958-65.
99. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002;347(13):975-82.
100. Nguyen MH, Keeffe EB. Prevalence and treatment of hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005;3(10 Supp 2):S97-101.
101. Legrand-Abravanel F, Sandres-Sauné K, Barange K, Alric L, Moreau J, et al. Hepatitis C virus genotype 5: epidemiological characteristics and sensitivity to combination therapy with interferon-alpha plus ribavirin. *J Infect Dis*. 2004;189(8):1397-400.
102. Fung J, Lai CL, Hung I, Young J, Cheng C, et al. Chronic hepatitis C virus genotype 6 infection: response to pegylated interferon and ribavirin. *J Infect Dis*. 2008;198(6):808-12.
103. Hoofnagle JH, Seeff LB. Peginterferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *N Engl J Med*. 2006;355(23):2444-51.



104. Di Bisceglie AM, Conjeevaram HS, Fried MW, Sallie R, Park Y, et al. Ribavirin as therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.* 1995;123(12):897-903.
105. Brok J, Gluud LL, Gluud C. Ribavirin monotherapy for chronic hepatitis C infection: a Cochrane Hepato-Biliary Group systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(4):842-7.
106. Everson GT, Hoefs JC, Seeff LB, Bonkovsky HL, Naishadham D, et al. Impact of disease severity on outcome of antiviral therapy for chronic hepatitis C: Lessons from the HALT-C trial. *Hepatology.* 2006;44(6):1675-84.
107. Kau A, Vermehren J, Sarrazin C. Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *J Hepatol.* 2008;49(4):634-51.
108. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, et al. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet.* 1998;352(9138):1426-32.
109. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med.* 1998;339(21):1485-92.
110. Foster GR, Fried MW, Hadziyannis SJ, Messinger D, Freivogel K, et al. Prediction of sustained virological response in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon alfa-2a (40KD) and ribavirin. *Scand J Gastroenterol.* 2007;42(2):247-55.
111. Berg T, von Wagner M, Nasser S, Sarrazin C, Heintges T, et al. Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1: comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon-alfa-2a plus ribavirin. *Gastroenterology.* 2006;130(4):1086-97.
112. Chen Y, Xu HX, Wang LJ, Liu XX, Mahato RI, et al. Meta-analysis: IL28B polymorphisms predict sustained viral response in HCV patients treated with pegylated interferon- $\alpha$  and ribavirin. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012;36(2):91-103.

113. Rangnekar AS, Fontana RJ. Meta-analysis: IL-28B genotype and sustained viral clearance in HCV genotype 1 patients. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012;36(2):104-14.
114. Snoeck E, Wade JR, Duff F, Lamb M, Jorga K. Predicting sustained virological response and anaemia in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon alfa-2a (40KD) plus ribavirin. *Br J Clin Pharmacol.* 2006;62(6):699-709.
115. Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J, Heathcote EJ, Lai MY, et al. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med.* 2000;343(23):1666-72.
116. Soresi M, Tripi S, Franco V, Giannitrapani L, Alessandri A, et al. Impact of liver steatosis on the antiviral response in the hepatitis C virus-associated chronic hepatitis. *Liver Int.* 2006;26(9):1119-25.
117. Reiberger T, Rutter K, Ferlitsch A, Payer BA, Hofer H, et al. Portal pressure predicts outcome and safety of antiviral therapy in cirrhotic patients with hepatitis C virus infection. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011;9(7):602-8.
118. Eslam M, Aparcero R, Kawaguchi T, Del Campo JA, Sata M, et al. Meta-analysis: insulin resistance and sustained virological response in hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;34(3):297-305.
119. Lupberger J, Felmlee DJ, Baumert TF. Interferon-lambda polymorphisms and hepatitis C virus clearance revisited. *Hepatology.* 2013;58(1):439-41.
120. Ndong N, Berthillon P, Pradat P, Vieux C, Bordes I, et al. Association of anti-E1E2 antibodies with spontaneous recovery or sustained viral response to therapy in patients infected with hepatitis C virus. *Hepatology.* 2010;52(5):1531-42.
121. Prokunina-Olsson L, Muchmore B, Tang W, Pfeiffer RM, Park H, et al. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat Genet.* 2013;45(2):164-71.
122. Chayama K, Hayes CN. Hepatitis C virus: How genetic variability affects pathobiology of disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26 Suppl 1:83-95.
123. Lens S, Alfaro I. Future prospects for hepatitis C treatment: without interferon and ribavirin? *Gastroenterol Hepatol.* 2014;37(5):311-21.

124. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, et al. Telaprevir for Previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Eng J Med*. 2011;364(25):2405-16.
125. Zeuzem S, Andreone P, Pol S, Lawitz E, Diago M, et al. Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N Eng J Med*. 2011;364(25):2417-28.
126. Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Marcellin P, Vierling JM, et al. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N Eng J Med*. 2011;364(13):1207-17.
127. Poordad F, McCone J, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Eng J Med*. 2011;364(13):1195-206.
128. Hézode C, Fontaine H, Dorival C, Larrey D, Zoulim F, et al. Triple therapy in treatment-experienced patients with HCV-cirrhosis in a multicentre cohort of the French Early Access Programme (ANRS CO20-CUPIC) - NCT01514890. *J Hepatol*. 2013;59(3):434-41.
129. Crespo G, Lens S. Use of boceprevir and telaprevir in patients with hepatitis C virus infection (practical considerations). *Gastroenterol Hepatol*. 2012;35(5):337-43.
130. European Association for the Study of the Liver. EASL recommendations on treatment of hepatitis C. 2014. Disponible en: [www.easl.eu](http://www.easl.eu)
131. Agencia Europea del Medicamento. Sovaldi® (sofosbuvir), ficha técnica. Disponible en: [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002798/WC500160597.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002798/WC500160597.pdf)
132. Lawitz E, Mangia A, Wyles D, Rodriguez-Torres M, Hassanein T, et al. Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. *N Engl J Med*. 2013;368(20):1878-87.
133. Kowdley KV, Lawitz E, Crespo I, Hassanein T, Davis MN, et al. Sofosbuvir with pegylated interferon alfa-2a and ribavirin for treatment-naive patients with hepatitis C genotype-1 infection (ATOMIC): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial. *Lancet*. 2013;381(9883):2100-7.

134. Agencia Europea del Medicamento. Olysio® (simeprevir), ficha técnica.  
Disponible en:  
[http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002777/WC500167867.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002777/WC500167867.pdf)
135. Forns X, Lawitz E, Zeuzem S, Gane E, Bronowicki JP, et al. Simepreir with peginterferon and ribavirin leads to high rates of SVR in patients with HCV genotype 1 who relapsed after previous therapy: a phase 3 trial. *Gastroenterology*. 2014;146(7):1669-79.
136. Zeuzem S, Berg T, Gane E, Ferenci P, Foster GR, et al. Simeprevir increases rate of sustained virologic response among treatment-experienced patients with genotype-1 infection: a phase IIb trial. *Gastroenterology*. 2014;146(2):430-41.
137. Manns M, Marcellin P, Poordad F, de Araujo ES, Buti M, et al. Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a or 2b plus ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2014;384(9941):414-26.
138. Agencia Europea del Medicamento. Daklinza® (daclatasvir), ficha técnica.  
Disponible en:  
[http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/003768/WC500172848.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/003768/WC500172848.pdf)
139. Hézode C, Hirschfield GM, Ghesquiere W, Sievert W, Rodriguez-Torres M, et al. Daclatasvir plus peginterferon alfa and ribavirin for treatment-naive chronic hepatitis C genotype 1 or 4 infection: a randomised study. *Gut*. 2015;64(6):948-56.
140. Osinusi A, Meissner EG, Lee YJ, Bon D, Heytens L, et al. Sofosbuvir and ribavirin for hepatitis C genotype 1 in patients with unfavorable treatment characteristics: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2013;310(8):804-11.
141. Lawitz E, Sulkowski MS, Ghalib R, Rodriguez-Torres M, Younossi ZM, et al. Simeprevir plus sofosbuvir, with or without ribavirin, to treat chronic infection with hepatitis C virus genotype 1 in non-responders to pegylated interferon and ribavirin and treatment-naive patients: the COSMOS randomised study. *Lancet*. 2014;384(9956):1756-65.

142. Sulkowski MS, Gardiner DF, Rodriguez-Torres M, Reddy KR, Hassanein T, et al. Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. *N Engl J Med*. 2014;370(3):211-21.
143. Agencia Europea del Medicamento. Harvony® (Ledispavir/Sofosbuvir), ficha técnica. Disponible en:  
[http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/003850/WC500177995.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/003850/WC500177995.pdf)
144. Afdhal N, Zeuzem S, Kwo P, Chojkier M, Gitlin N, et al. Ledipasvir and sofosbuvir for untreated HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med*. 2014;370(20):1889-98.
145. Lawitz E, Poordad FF, Pang PS, Hyland RH, Ding X, et al. Sofosbuvir and ledipasvir fixed-dose combination with and without ribavirin in treatment-naïve and previously treated patients with genotype 1 hepatitis C virus infection (LONESTAR): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet*. 2014;383(9916):515-23.
146. Kowdley KV, Gordon SC, Reddy KR, Rossaro L, Bernstein DE, et al. Ledipasvir and sofosbuvir for 8 or 12 weeks for chronic HCV without cirrhosis. *N Engl J Med*. 2014;370(20):1879-88.
147. Andreone P, Colombo MG, Enejosa JV, Koksai I, Ferenci P, et al. ABT-450, ritonavir, ombitasvir, and dasabuvir achieves 97% and 100% sustained virologic response with or without ribavirin in treatment-experienced patients with HCV genotype 1b infection. *Gastroenterology*. 2014; 147(2):359-65.
148. Zeuzem S, Jacobson IM, Baykal T, Marinho RT, Poordad F, et al. Retreatment of HCV with ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with ribavirin. *N Engl J Med*. 2014; 370(17):1604-14.
149. Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, et al. Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C virus genotype 1b high viral load and non-virological response to interferon-ribavirin combination therapy. *Intervirology*. 2005;48(6):372-80.
150. Siemens Healthcare Diagnostics. Guía Rápida para Genotipado TRUGENE-Siemens Healthcare Diagnostics. 2010.

151. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-5467.
152. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Eng J Med*. 1996;334(2):77-81.
153. Suarez A, Palomo M, Pena I, Ladero JM, Picazo JJ. Mutations in the Core and NS5A Regions, in patients infected with Hepatitis C Virus genotype 1b. "53<sup>rd</sup>. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) 2013". Denver, 2013.
154. Poynard T, McHutchison J, Goodman Z, Ling MH, Albrecht J. Is an "a la carte" combination interferon alfa-2b plus ribavirin regimen possible for the first line treatment in patients with chronic hepatitis C? The ALGOVIRC Project Group. *Hepatology*. 2000;31(1):211-8.
155. Romero-Gómez M, Del Mar Viloria M, Andrade RJ, Salmerón J, Diago M, et al. Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology*. 2005;128(3):636-41.
156. Okanoue T, Itoh Y, Hashimoto H, Yasui K, Minami M, et al. Predictive values of amino acid sequences of the core and NS5A regions in antiviral therapy for hepatitis C: a Japanese multi-center study. *J Gastroenterol*. 2009;44(9):952-63.
157. Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, et al. Predictors of viral kinetics to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b. *J Med Virol*. 2007;79(11):1686-95.
158. Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, et al. Predictive factors of early and sustained responses to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b: amino acid substitutions in the core region and low-density lipoprotein cholesterol levels. *J Hepatol*. 2007;46(3):403-10.
159. Villa E, Karampatou A, Cammà C, Di Leo A, Luongo M, et al. Early menopause is associated with lack of response to antiviral therapy in women with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2011;140(3):818-29.

160. Kogure T, Ueno Y, Fukushima K, Nagasaki F, Kondo Y, et al. Pegylated interferon plus ribavirin for genotype 1b chronic hepatitis C in Japan. *World J Gastroenterol.* 2008;14(47):7225-30.
161. El-Shamy A, Kim SR, Ide YH, Sasase N, Imoto S, et al. Polymorphisms of hepatitis C virus non-structural protein 5A and core protein and clinical outcome of pegylated-interferon/ribavirin combination therapy. *Intervirology.* 2012;55(1):1-11.
162. Hayashi K, Katano Y, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, et al. Mutations in the core and NS5A region of hepatitis C virus genotype 1b and correlation with response to pegylated-interferon-alpha 2b and ribavirin combination therapy. *J Viral Hepat.* 2011;18(4):280-6.
163. Alestig E, Arnholm B, Eilard A, Lagging M, Nilsson S, et al. Core mutations, IL28B polymorphisms and response to peginterferon/ribavirin treatment in Swedish patients with hepatitis C virus genotype 1 infection. *BMC Infect Dis.* 2011;11:124.
164. Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, et al. Predictive factors of virological non-response to interferon-ribavirin combination therapy for patients infected with hepatitis C virus of genotype 1b and high viral load. *J Med Virol.* 2006;78(1):83-90.
165. Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, et al. A matched case-controlled study of 48 and 72 weeks of peginterferon plus ribavirin combination therapy in patients infected with HCV genotype 1b in Japan: amino acid substitutions in HCV core region as predictor of sustained virological response. *J Med Virol.* 2009;81(3):452-8.
166. Hayashi K, Katano Y, Honda T, Ishigami M, Itoh A, et al. Association of interleukin 28B and mutations in the core and NS5A region of hepatitis C virus with response to peg-interferon and ribavirin therapy. *Liver Int.* 2011;31(9):1359-65.
167. Mori N, Imamura M, Kawakami Y, Saneto H, Kawaoka T, et al. Randomized trial of high-dose interferon-alpha-2b combined with ribavirin in patients with chronic hepatitis C: Correlation between amino acid substitutions in the

- core/NS5A region and virological response to interferon therapy. *J Med Virol.* 2009;81(4):640-9.
168. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, et al. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. *J Hepatol.* 2011;54(3):439-48.
169. Hayes CN, Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Kumada H, et al. HCV substitutions and IL28B polymorphisms on outcome of peg-interferon plus ribavirin combination therapy. *Gut.* 2011;60(2):261-7.
170. El-Shamy A, Shoji I, Saito T, Watanabe H, Ide YH, et al. Sequence heterogeneity of NS5A and core proteins of hepatitis C virus and virological responses to pegylated-interferon/ribavirin combination therapy. *Microbiol Immunol.* 2011;55(6):418-26.
171. Toyoda H, Kumada T, Tada T, Arakawa T, Hayashi K, et al. Association between HCV amino acid substitutions and outcome of peginterferon and ribavirin combination therapy in HCV genotype 1b and high viral load. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010;25(6):1072-8.
172. Donlin MJ, Cannon NA, Yao E, Li J, Wahed A, et al. Pretreatment sequence diversity differences in the full-length hepatitis C virus open reading frame correlate with early response to therapy. *J Virol.* 2007;81(15):8211-24.
173. Di Lello FA, Mira JA, Neukam K, Parra-Sánchez M, Guelfo JR, et al. Core amino acid variation at position 110 is associated with sustained virological response in Caucasian patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *Arch Virol.* 2014;159(12):3345-51.
174. Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, et al. Amino acid substitution in hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin. *Hepatology.* 2010;52(2):421-9.
175. Akuta N, Suzuki F, Fukushima T, Kawamura Y, Sezaki H, et al. Prediction of treatment efficacy and telaprevir-resistant variants after triple therapy in



- patients infected with hepatitis C virus genotype 1. *J Clin Microbiol.* 2013;51(9):2862-8.
176. Luquin E, Larrea E, Civeira MP, Prieto J, Aldabe R. HCV structural proteins interfere with interferon-alpha Jak/STAT signalling pathway. *Antiviral Res.* 2007;76(2):194-7.
177. De Lucas S, Bartolomé J, Carreño V. Hepatitis C virus core protein down-regulates transcription of interferon-induced antiviral genes. *J Infect Dis.* 2005;191(1):93-9.
178. Funaoka Y, Sakamoto N, Suda G, Itsui Y, Nakagawa M, et al. Analysis of interferon signaling by infectious hepatitis C virus clones with substitutions of Core amino acids 70 and 91. *J Virol.* 2011;85(12):5986-94.
179. Muñoz de Rueda P, Casado J, Patón R, Quintero D, Palacios A, et al. Mutations in E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR, and NS5A-V3 of hepatitis C virus genotype 1 and their relationships to pegylated interferon-ribavirin treatment responses. *J Virol.* 2008;82(13):6644-53.
180. Yen YH, Hung CH, Hu TH, Chen CH, Wu CM, et al. Mutations in the interferon sensitivity-determining region (nonstructural 5A amino acid 2209-2248) in patients with hepatitis C-1b infection and correlating response to combined therapy of pegylated interferon and ribavirin. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008;27(1):72-9.
181. Sáiz JC, López-Labrador FX, Ampurdanés S, Dopazo J, Fornés X, et al. The prognostic relevance of the nonstructural 5A gene interferon sensitivity determining region is different in infections with genotype 1b and 3a isolates of hepatitis C virus. *J Infect Dis.* 1998;177(4):839-47.
182. Squadrito G, Leone F, Sartori M, Nalpas B, Berthelot P, et al. Mutations in the nonstructural 5A region of hepatitis C virus and response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Gastroenterology.* 1997;113(2):567-72.
183. Kurosaki M, Enomoto N, Murakami T, Sakuma I, Asahina Y, et al. Analysis of genotypes and amino acid residues 2209 to 2248 of the NS5A region of hepatitis C virus in relation to the response to interferon-beta therapy. *Hepatology.* 1997;25(3):750-3.

184. Chayama K, Tsubota A, Kobayashi M, Okamoto K, Hashimoto M, et al. Pretreatment virus load and multiple amino acid substitutions in the interferon sensitivity-determining region predict the outcome of interferon treatment in patients with chronic genotype 1b hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 1997;25(3):745-9.
185. Chung RT, Monto A, Dienstag JL, Kaplan LM. Mutations in the NS5A region do not predict interferon-responsiveness in american patients infected with genotype 1b hepatitis C virus. *J Med Virol*. 1999;58(4):353-8.
186. Pascu M, Martus P, Höhne M, Wiedenmann B, Hopf U, et al. Sustained virological response in hepatitis C virus type 1b infected patients is predicted by the number of mutations within the NS5A-ISDR: a meta-analysis focused on geographical differences. *Gut*. 2004;53(9):1345-51.
187. Gale M Jr, Blakely CM, Kwieciszewski B, Tan SL, Dossett M, et al. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol*. 1998;18(9):5208-18.
188. Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, et al. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol*. 2001;75(13):6095-106.
189. Polyak SJ, Khabar KS, Rezeiq M, Gretch DR. Elevated levels of interleukin-8 in serum are associated with hepatitis C virus infection and resistance to interferon therapy. *J Virol*. 2001;75(13):6209-11.
190. Shirakawa H, Matsumoto A, Joshita S, Komatsu M, Tanaka N, et al. Pretreatment prediction of virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients using viral and host factors. *Hepatology*. 2008;48(6):1753-60.
191. Cappiello G, Abbate I, Lo Iacono O, Longo R, Solmone M, et al. ISDR pattern and evolution in patients with chronic hepatitis C treated with standard or PEG-IFN plus ribavirin. *Antivir Ther*. 2003;8(2):105-10.
192. Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, et al. Sequences in the interferon sensitivity-determining region and core region of hepatitis C virus

impact pretreatment prediction of response to PEG-interferon plus ribavirin: data mining analysis. J Med Virol. 2011;83(3)445-52.